UNTERSUCHUNGEN DER GENETISCHEN DEFEKTE UND ZUR GEWEBEKULTUR DER PLASTOMMUTANTEN UND GENOM/PLASTOM – ARTBASTARDE VON OENOTHERA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jörg W. Hildebrandt
aus Mühlhausen in Thüringen

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0084

UNTERSUCHUNGEN DER GENETISCHEN DEFEKTE UND ZUR GEWEBEKULTUR DER PLASTOMMUTANTEN UND GENOM/PLASTOM-ARTBASTARDE VON OENOTHERA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
JÖRG W. HILDEBRANDT
aus
Mühlhausen in Thüringen
1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. G. Herrmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bünemann
Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	2
2. Material und Methoden	7
1. Erzeugung und Anzucht von genetisch reinem Saat- und Pflanzengut	7
A) Herkunft des Pflanzenmaterials und des Saatgutes	7
B) Anzucht in Gewebekultur	7
a) Arbeitsbedingungen	7
b) Vorbehandlung des Saatgutes	8
c) Keimung	8
d) Pflanzenanzucht	10
e) Cytologie/Photographie	12
2. Plastidenisolation	14
3. Polyacrylamid Gelektrophorese (PAGE)	16
a) Trennung von löslichen und membrangebundenen Proteinen der Plastiden	16
b) Vorbereitung der Proben	18
c) Elektrophorese	18
4. Analyse der Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase	21
a) Isolation und Reinigung der RuBPcase/oase aus Oenothera	21
b) Vorbereiten der DEAE-Zellulose-Säule	21
c) Zentrifugation in Saccharosegradienten	22
d) Trennung der Untereinheiten	22
5. Immunologie	23
a) Antikörperherstellung	23
b) "Immunotransfer"-Analyse	24
c) Immunopräzipitation	24
6. Nucleinsäurenisolation und -Analyse	26
a) DNA-Isolation aus Plastiden von Oenothera	26
b) DNA-Isolation aus Plastiden von Spinat	27
c) "nick-Translation"	28
d) RNA-Isolation aus Plastiden von Oenothera	28
e) Isolation von Gesamtzell-RNA und Trennung der polyadenylierten von der nicht polyadenylierten RNA an Oligo-(dT)-Zellulose	30

Seite

f) Elektrophoresе der RNA in Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen 31
g) Transfer der RNAs auf Nitrocellulosefilter nach Patricia S. Thomas (1980) 31
h) Hybridisierung mit "nick-translatierter" DNA nach Wahl et al. (1979) 32
i) Zellfreie Translation von RNA und DNA 32
3. Ergebnisse 33
1. Gewebekultur 33
A) Der Einfluß von Hormonen auf die Differenzierung von Organen aus verschiedenen Pflanzenteilen 33
I. Differenzierung aus Keimblättern 34
a) Sproßdifferenzierung 34
b) Wurzeldifferenzierung 36
c) Kallusbildung 36
d) Bildung von kompletten Pflänzchen 36
II. Differenzierung aus Vegetationskegelbereichen 37
a) Sproßdifferenzierung 37
b) Wurzeldifferenzierung 37
c) Kallusbildung 37
d) Bildung von kompletten Pflänzchen 37
III. Differenzierung aus Hypokotylen 38
a) Sproßdifferenzierung 38
b) Wurzeldifferenzierung 38
c) Kallusbildung 38
d) Bildung von kompletten Pflänzchen 39
IV. Differenzierung aus Wurzeln 39
a) Sproßdifferenzierung 39
b) Wurzeldifferenzierung 39
c) Kallusbildung 40
d) Bildung von kompletten Pflänzchen 40
B) Versuche zur Aufhebung der Differenzierungshemmung von 2,4-D nach längerer Einwirkung auf Kallus aus Gewebe von Oenothera hookeri 53
I. Redifferenzierung von ganzen Pflänzchen aus Kallus nach längerem Einfluß von 2,4-D 53

Seite

II. Versuche zur Redifferenzierung ganzer Pflanzen aus Kallus, der mehr als drei Jahre unter dem Einfluß von 2,4-D stand 57
a) Temperatur 58
b) Licht 59
c) Hormone 59
C) Gewebekultur der Mutanten und der vorhandenen Genom/Plastom-Kombinationen der Euoenotheren 63
I. Mutanten 63
II. Genom/Plastom-Kombinationen 67
D) Cytologische Untersuchungen an Gewebekulturmaterial von Mutanten, das auf Medium mit und ohne 2,4-D wächst 68
a) Kallus der drei Jahre auf 2,4-D enthaltendem Medium gewachsen war 68
b) Kallus aus den Redifferenzierungsversuchen B II 68
2. Molekularbiologische Untersuchungen an Oenothera 73
A) "Screening" des gesamten Oenotheramaterials mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese der plastidären Proteine 74
a) Voraussetzungen für die Proteinanalyse 75
b) Analyse der Genom/Plastom-Kombinationen 76
c) Chrakterisierung der Plastommutanten 76
1. Die membrangebundenen Proteine 76
2. Die löslichen Proteine 77
B) Detailanalyse der Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase Mutanten 81
1. Immunologische Untersuchungen 81
a) Isolation und Reindarstellung der RuBPcase/oase von Oenothera 82
b) Die Erzeugung von Antikörpern gegen die SSU der Oenothera-RuBPcase/oase 86
2. Die Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Untereinheiten der RuBPcase/oase von Oenothera 86

Seite

C) Die Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase-Mutante I sigma 89

1. Analyse der Ursache für die Bildung des Partialproduktes der LSU 89

2. Analyse der SSU in der Mutante I sigma 92

4. Diskussion 95

A. Gewebekultur an Oenothera 95

B. Molekularbiologische Untersuchungen an Oenothera 105

5. Zusammenfassung 111

6. Literaturverzeichnis 113

7. Danksagung 136

8. Lebenslauf 137

Verzeichnis der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen

BAP	6-Benzylaminopurin
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumin aus Rinderserum)
2,4-D	Dichlorphenoxyessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
g	$=g_{max}$
IPA	Isopentenylaminopurin
kD	Kilodalton
LSU	große Untereinheit der RuBPcase/oase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MES	Morpholinoethansulfonsäure
NAA	α-Naphtylessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffersystem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RuBPcase/ oase	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
SSU	kleine Untereinheit der RuBPcase/oase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	N-α-p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon
TPCK	L-1-Tosylamid-2-phenyl-ethylchloromethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

EINLEITUNG

Betrachtet man den Übergang von den Ein- zu den Vielzellern, so sind die wesentlichsten Charakteristiken, durch die sich eukaryotische von prokaryotischen Organismen unterscheiden, eine sehr viel größere Menge an Erbgut, die Kompartimentierung des genetischen Apparates und die Differenzierung von Zellen. Die Ontogenie und Phylogenie höherer pflanzlicher Zellen beispielsweise, hängt von dem Zusammenspiel dreier genetischer Kompartimente ab (Zellkern/Cytosol, Plastide, Mitochondrium). Die Plastide selbst ist ein Organell, das - im Gegensatz zum Mitochondrium - in architektonisch ganz verschiedenen Modifikationen auftritt, die im Organismus auch ganz verschiedene Funktionen erfüllen. So sind Chloroplasten Sitz der Photosynthese, Amyloplasten speichern Kohlehydrate und Chromoplasten haben verbreitungsökologische Bedeutung. In multizellulären Organismen laufen diese Prozesse räumlich voneinander getrennt, in verschiedenen Organen des Pflanzenkörpers, ab. Es ist evident, daß das molekulare Verständnis höherer Organismen die Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen diesen Zellkompartimenten voraussetzt und deshalb Experimentalansätze auf ganz verschiedenen Ebenen nötig sind, um diese zu analysieren. Diese Ansätze reichen von der reinen Molekularbiologie über die Entwicklungsphysiologie bis hin zur klassischen Genetik.

Im Gegensatz zu Prokaryoten, deren Bearbeitung wesentlich von der Verfügbarkeit geeigneten Mutantenmaterials abhing, mangelt es allerdings an genetisch gut charakterisierten Materialien von höheren Pflanzen, insbesondere wenn die Genetik aller Kompartimente betrachtet wird. - In den meisten Fällen, wie z.B. bei Nicotiana, Arabidopsis und einigen Getreiden, sind nur die Kernsysteme gut untersucht. - Mit der Gattung Oenothera liegt eines der wenigen pflanzlichen Materialien vor, das mit Hilfe klassischer genetischer Forschung vor allem von Renner (1934), Stubbe (1959) und

Cleland (1972) umfassend charakterisiert worden ist. Von dieser Gattung existiert eine Genetik sowohl des Kerns als auch der Plastide (Stubbe, 1959) und des Mitochondriums (Schwemmle, 1962). Außerdem bietet die Kombinierbarkeit artfremder Kerne und Organellen durch Artkreuzungen ideale Voraussetzungen zur Analyse von Genom/Plastom-Wechselwirkungen. Von den fünf Subsektionen der Oenothera, die etwa 80 Arten umfassen (Cleland, 1972), ist die Subsektion Euoenothera am intensivsten studiert (Stubbe, 1959). Bei ihr treten drei morphologisch und genetisch klar unterscheidbare Grundgenome (A, B und C) sowie fünf Grundplastome auf (I-V). Dazu kommen noch ca. 50 Plastommutanten, die von allen fünf Wildplastomen isoliert wurden. Diese Mutanten wurden an ihrem farblichen Unterschied zum Wildtyp erkannt. Etwa 20 hat man mittlerweile elektronenmikroskopisch und physiologisch untersucht und aufgrund ihrer Defekte klassifiziert (Kutzelnigg & Stubbe, 1974; Kutzelnigg et al., 1975a und b; Hallier, 1980). Sie sind fast alle im Photosyntheseapparat geschädigt.

Es war daher wünschenswert, dieses Material genauer zu studieren, d.h. mit Gewebekultur dieses Materials den Zugang zu komplexeren Ebenen der Analyse zu ebnen und darüberhinaus das verfügbare Sortiment an Genom/Plastom-Artbastarden und an Plastommutanten biochemisch genauer zu charakterisieren. Denn zum einen konnten bisher die allein nicht lebensfähigen Mutanten nur in Form panaschierter Pflanzenteile, d.h. vergesellschaftet mit dem Wildtyp als Versorgungsquelle, erhalten werden, was die Beschaffung ausreichender Materialmengen für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen schier unmöglich machte. Zum anderen wird der biochemische und molekularbiologische Ansatz dann erschwert, wenn Pflanzen Sekundärstoffe produzieren, die mit der Isolation und Reinigung der Zellorganellen oder deren Aufschluß und die Trennung in die einzelnen Komponenten wie Proteine, DNA und RNA interferieren. Dies ist leider bei Oenotheren der Fall, die abundant phenolische Gerbstoffe, Schleime und Oxalatraphiden produzieren.

Die Idee der Gewebekultur - dem ersten der beiden eben genannten Aspekte - genauer die in vitro Kultur von Gewebe, basiert auf dem Postulat von der "Totipotenz der Zelle" (Schleiden, 1838; Schwann, 1839). An der Realisierung der Kultur pflanzlichen Gewebes ist von vielen Wissenschaftlern seit 1902 gearbeitet worden (Zusammenfassende Darstellungen siehe Street, 1977; Reinert & Bajaj, 1977; Vasil, 1980; Evans et al., 1983).

Nachdem es White (1934) erstmalig gelungen war, abgeschnittene Wurzeln von Tomaten in einem Nährmedium unbegrenzt wachsen zu lassen, wurden bis heute viele Medien für die verschiedensten Pflanzen- und Gewebearten und die unterschiedlichsten Bedürfnisse entwickelt. Dabei kann man grundsätzlich zwischen Medien mit genau definierten Komponenten und solchen mit Zusätzen von organischen Nährlösungen wie Hefeextrakt, Kokosnußmilch u.ä. unterscheiden. Seit der Entdeckung des Kinetins durch Miller et al. (1955) und den Untersuchungen von Skoog und Miller (1957) über das Zusammenwirken mit Auxin bei der Morphogenese, versuchte man mit definierten Medien ohne Zugabe von komplexen Nährlösungen auszukommen.- Auxin war schon 1928 von Went entdeckt und 1934 von Kögl et al. isoliert worden.- Systematische Untersuchungen über die Notwendigkeit der anderen organischen und anorganischen Komponenten in den Kulturmedien waren von White schon 1943 durchgeführt worden. Das erste Medium, das tatsächlich nur noch definierte Bestandteile enthielt, wurde jedoch erst 1962 von Murashige und Skoog, nach der Auswertung ihrer Wachstumsversuche an Tabak, entwickelt.

Die Analyse des genetischen Apparates höherer Organismen - der zweite erwähnte Aspekt -, hat in den vergangenen Jahren viele Fortschritte gemacht (Parthier & Boulter, 1982). Dies betrifft neben dem Zellkern vor allem auch die - wegen ihrer überschaubaren Menge an genetischer Information - gut zugänglichen Genome der Organellen. Man weiß,

daß das Erbgut von Organellen (Plastom und Chondriom) Teile der organelleigenen Translationsmaschinerie sowie Teile von Strukturen, die fundamentale Programme des Energiestoffwechsels durchführen, verschlüsseln (Plastide: Photosynthese, Mitochondrium: Zellatmung; Herrmann & Possingham, 1980; Leaver & Gray, 1982). Strukturen wie Ribosomen, Thylakoidmembran oder innere mitochondrielle Membran sind dualen genetischen Ursprungs. Ihre Gene sind teils im Zellkern, teils in den Organellgenomen niedergelegt. Von den Organellgenomen wurden Restriktionskarten erstellt und bis zu 60 Gene identifiziert und physikalisch kartiert (Herrmann et al., 1985; Leaver & Gray, 1982).

Aus den skizzierten Aspekten ergaben sich folgende Aufgaben für diese Arbeit:

1. Es sollten geeignete Kulturbedingungen für die Oenothera-gewebe gefunden werden, Bedingungen, die es ermöglichen, auch extrem disharmonische Genom/Plastom-Kombinationen sowie alle Mutanten, die auf Erdkultur nicht lebensfähig sind, anzuziehen und in ausreichenden Mengen für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu erzeugen. Nach Möglichkeit sollte auf dem Medium die Produktion pflanzlicher Sekundärstoffe eingeschränkt sein.

2. Die bereits vorhandenen Isolationsmethoden für Zellorganellen sollten dem sehr unterschiedlichen Ausgangsmaterial, Wildtypen, Genom/Plastom-Kombinationen (vor allem disharmonische) und Mutanten mit ihren labilen Organellen angepaßt werden.

3. Das gesamte Euoenothera-Sortiment, d.h. alle Wildtypen, alle Genom/Plastom-Kombinationen und alle Mutanten sollten mit geeigneten biochemischen Methoden gesichtet, frühere physiologische Untersuchungen an Mutanten (Hallier, 1980) mit unabhängigen Methoden überprüft, ergänzt und auf alle Mutanten erweitert werden, um einen Überblick über das gesamte Sortiment zu bekommen.

4. Aus den verschiedenen Mutantenklassen wurde schließlich die Gruppe der RuBPcase/oase-Mutanten gezielt einer genaueren Studie unterworfen. Ziele dieses Teilprojektes waren die Analyse des molekularen Defektes und, nach Möglichkeit, weitere Erkenntnisse über die Genom/Plastom-Wechselwirkungen bei der Biogenese dieses Enzyms zu erhalten, dessen Untereinheiten teils genom-, teils plastomkodiert sind.

MATERIAL UND METHODEN

1. Erzeugung und Anzucht von genetisch reinem Saat- und Pflanzengut

A) Herkunft des Pflanzenmaterials und des Saatgutes

Das Pflanzenmaterial der Euoenothera Wildtypen stammte größtenteils aus den Gewächshäusern der Botanischen Institute, wurde aber auch in der Gewebekultur aus Saatgut geselbsteter Pflanzen herangezogen. Das Saatgut der Euoenothera Plastommutanten stammte aus Selbstungen, die auf dem Versuchsfeld von Prof. Stubbe gemacht wurden. Pflanzen aus diesem Saatgut sind aufgrund der Defekte in den Plastiden auf Erde nicht lebensfähig. Daher konnte dieses Material nur in der Gewebekultur gezogen werden (Stubbe & Herrmann, 1982).

Genom/Plastom-Artbastarde konnten durch entsprechende Kreuzungen erzielt werden, wobei oft mehrere Zwischenkreuzungen notwendig waren. In vielen Fällen spaltete das so erzielte Saatgut in zwei mögliche Genom/Plastom-Kombinationen auf, die sich aber schon im Keimlingsstadium farblich unterschieden. Diese phänotypischen Merkmale wurden zur Selektion der gewünschten Artbastarde herangezogen, die dann in der Gewebekultur weiter kultiviert wurden (Stubbe, 1959).

B) Anzucht in Gewebekultur

a) Arbeitsbedingungen

Da eine Gewebekultur nur unter sterilen Bedingungen möglich ist, mußten Vorkehrungen getroffen werden, um Infektionen zu vermeiden. So wurden alle Arbeiten in einem Reinraumgerät der Firma CEAG durchgeführt. Instrumente wie Spatel, Pinzetten, Scheren und Skalpelle wurden vor jedem Benutzen über

einem Bunsen- oder Spiegelbrenner mehrfach ausgeglüht und in technischen Alkohol eingetaucht; Lösungen und Kulturmedien wurden autoklaviert (120°C, 1 atü, 30 min), ebenso das verwendete Membran-Filtergerät aus Edelstahl (Typ SM 16245, Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen), durch das man die Lösungen der nicht autoklavierbaren Hormone mit ca. 2 atü preßte (Zelluloseacetatfilter, Porengröße 0.2 µM, Sartorius SM 11307); Pipetten wurden trocken bei 150°C für 3 Std. in Aluminiumdosen sterilisiert. Vor jedem Benutzen des Reinraumgerätes wurde dessen Arbeitsfläche gründlich mit technischem Alkohol abgerieben, die Hände gewaschen und ebenfalls mit Alkohol oder einem Desinfektionsmittel (Sagromed) abgerieben.

b) Vorbehandlung des Saatgutes

Die Samen wurden ca. 15 Std. in Reagenzgläsern in Wasser vorgequollen. Nach dem Absaugen des Wassers wurden sie etwa 30 min unter dem Abzug mit Chlorwasser behandelt, das immer frisch durch Tropfen von konz. HCl auf $KMnO_4$ und Einleiten des entstehenden Chlorgases in destilliertes Wasser hergestellt worden war. Das Chlorwasser wurde ebenfalls abgesaugt und die Reagenzgläser mit den Samen in das Reinraumgerät gestellt. Dann wurden die Samen mindestens dreimal mit viel sterilem bidestillierten Wasser gewaschen, um das Chlor vollends zu entfernen, bevor sie ausgesät werden konnten.

c) Keimung

Zur Keimung der Samen wurde das "MS-Medium" verwendet. Es basiert auf einem Medium, das von Murashige und Skoog (1962) für Tabakgewebe entwickelt worden war, weicht aber in folgenden Punkten vom Originalmedium ab: Es wurde nur 1/5 der Menge der Makroelemente genommen und auf den Zusatz von Edamin und Hormonen verzichtet; Eisensulfat wurde durch Eisencitrat ersetzt; der Saccharoseanteil auf 20 g/l erniedrigt und die Agarkonzentration auf 13 g/l erhöht (siehe Tabelle I).

Tabelle I

"MS-Medium" (Murashige & Skoog, 1962); für die Keimung verwendete Konzentrationen

Makroelemente:

NH_4NO_3	330,00 mg/l	(4,12 mM)
KNO_3	380,00 mg/l	(3,76 mM)
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	88,00 mg/l	(0,60 mM)
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	74,00 mg/l	(0,30 mM)
KH_2PO_4	34,00 mg/l	(0,25 mM)
Na_2 - EDTA	7,46 mg/l	(EDTA = 20 µM)
Fe-Citrat	5,56 mg/l	(Fe = 20 µM)
H_3BO_3	1,24 mg/l	(20 µM)
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	4,46 mg/l	(20 µM)
$ZnSO_4 \times 4\ H_2O$	1,72 mg/l	(6 µM)

Mikroelemente:

KJ	0,830 mg/l	(5,0 µM)
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,250 mg/l	(1,0 µM)
$CuSo_4 \times 5\ H_2O$	0,025 mg/l	(0,1 µM)
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,025 mg/l	(0,1 µM)

Vitamine:

Glycin	2,0	mg/l
Myo-Inosit	100,0	mg/l
Nicotinsäure	0,5	mg/l
Pyridoxalhydrochlorid	0,5	mg/l
Thiaminiumdichlorid	0,1	mg/l

Saccharose	20,0	g/l
Agar	13,0	g/l

Zur Arbeitserleichterung wurden Stammlösungen angesetzt und zwar eine 8-fach konzentrierte der Makroelemente, eine 1000-fach konzentrierte der Mikroelemente und eine 100-fach konzentrierte der organischen Bestandteile. Für alle Medien wurden grundsätzlich nur p.A.-Chemikalien verwendet.

Die Keimlinge wurden auf Schrägagarkulturen in Röhrchen (Duran 50, Ø 2,5 cm, Länge 15 cm) oder in hohen Petrischalen (Ø 10 cm, Höhe 6 cm) angezogen. In beiden Fällen wurden zuerst Agar und Saccharose eingewogen, entsprechende Mengen der konzentrierten Stammlösungen dazupipettiert, mit bidestilliertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt, der pH-Wert kontrolliert und unter Rühren gekocht, bis der Agar gelöst war. Dann wurden, bei Schrägagarkulturen, je 25 ml in die Röhrchen gefüllt, diese mit Steristopfen verschlossen und autoklaviert. Zum Abkühlen wurden die Röhrchen schräg auf Bretter mit Halterungen gelegt, damit eine möglichst große Agaroberfläche entstand. Bei der Kultur in Petrischalen wurden je 100 ml eingefüllt, die Schalen mit Glasdeckeln verschlossen und dann autoklaviert.

Nach dem Erkalten des Mediums wurden die sterilisierten Samen mit einer keimfreien Pinzette auf die Oberfläche des nun festen Agars abgesetzt und leicht angedrückt. In ca. 10 Tagen keimten die Samen bei 23°C und 16 Std. täglicher Beleuchtung mit 3000 Lux in der Kulturkammer.

d) Pflanzenanzucht

Die weitere Kultur erfolgte nun generell in hohen Petrischalen auf "NT-Medium", welches von Nagata und Takebe (1971) für Tabakprotoplasten entwickelt worden war; wobei Eisensulfat wieder gegen Eisencitrat ausgetauscht, D-Mannit weggelassen, der Zusatz von Saccharose auf 30 g/l und von Agar auf 15 g/l erhöht wurden (siehe Tabelle II). Bei der Suche nach geeigneten Hormonzusätzen für ein möglichst optimales Gewebekulturmedium zur Anzucht der Oenotheren wurden, neben dem Auxin NAA, die Cytokinine BAP, IPA,

Tabelle II

"NT-Medium" (Nagata & Takebe, 1971); Endkonzentrationen im Medium

Makroelemente:

NH_4NO_3	825,0 mg/l (10,3 mM)
KNO_3	950,0 mg/l (9,4 mM)
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	220,0 mg/l (1,5 mM)
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1233,0 mg/l (5,0 mM)
KH_2PO_4	680,0 mg/l (5,0 mM)
Na_2 - EDTA	37,3 mg/l (EDTA = 100 µM)
Fe-Citrat	27,8 mg/l (Fe = 100 µM)
H_3BO_3	6,2 mg/l (100 µM)
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	22,3 mg/l (100 µM)
$ZnSO_4 \times 4\ H_2O$	8,6 mg/l (30 µM)

Mikroelemente:

KJ	0,830 mg/l (5,0 µM)
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,250 mg/l (1,0 µM)
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,025 mg/l (0,1 µM)
$CoSO_4 \times 7\ H_2O$	0,030 mg/l (0,1 µM)

Vitamine:

Myo-Inosit	100,0 mg/l
Thiaminiumdichlorid	1,0 mg/l
Saccharose	30,0 g/l
Agar	15,0 g/l

trans- und "mixed"-Zeatin eingesetzt. Dabei konnten, mit Ausnahme der Zeatine, alle Hormone dem Medium schon vor dem Autoklavieren zugesetzt werden. Die Zeatine hingegen wurden steril filtriert und konnten erst nach dem Autoklavieren ins Medium gegeben werden, da sie sonst degradiert würden.

Weiterhin wurde das Hormon 2,4-D, das die Differenzierung dikotyler Pflanzen hemmt ("weed-killer"), zur Erzeugung von Kallus verwendet. Es konnte dem Medium ebenfalls schon vor dem Autoklavieren zugesetzt werden.

Alle Differenzierungs- und Kulturversuche wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie sie für die Samenkeimung beschrieben sind. Das Kulturgut wurde alle sechs Wochen auf neues Medium umgesetzt und dabei von geschädigtem Blattmaterial und von Kallus befreit.

e) Cytologie/Photographie

Das zu untersuchende Gewebe wurde 3-4 Std. mit 2 mM 8-Hydroxychinolin vorbehandelt, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in einer Essigsäure/Chloroform/Alkohol-Mischung (1 : 3 : 6) mindestens 18 Std. fixiert. Zur Mikroskopie wurde das fixierte Gewebe auf Filterpapier leicht angetrocknet und die Zellen und Chromosomen durch zehnminütiges Kochen in einer vierprozentigen Karminessigsäurelösung angefärbt, mindestens 30 min stehengelassen und dann Quetschpräparate hergestellt (Gerlach, 1969; Partanen, 1973; Kao, 1975). Beobachtet wurde unter dem Mikroskop bei 300 bis 600-facher Vergrößerung. Photographiert wurden die Chromosomenplatten mit Ölimmersion bei 750- bzw. 1500-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Photoaufsatzes und einer Leica-Kassette bei den für Blende 8 angegebenen Zeiten, die mit dem Belichtungsmesser ermittelt worden waren. Filmmaterial war entweder Agfa-Ortho oder Agfa-Pan Professional (15 DIN).

Redifferenzierungsversuche wurden mit einer Leica-Kamera bzw. einer Aristophot-Einrichtung (beide von Leitz, Wetzlar) und dem gleichen Agfa-Filmmaterial dokumentiert.

Alle Farbphotos wurden mit einer Leica-Kamera unter Verwendung eines indirekten Blitzes mit Kodakfilmen CP 100 (21 DIN) gemacht.

2. Plastidenisolation

Als Ausgangsmaterial dienten in der Gewebekultur gezogene Pflanzen, die ca. vier Wochen vor der Ernte nochmals auf frisches Medium umgesetzt worden waren, um möglichst viele gut wüchsige Pflanzen zu erhalten. Die Blätter wurden geerntet, von anhängendem Agar und alterndem Blattmaterial befreit, gewaschen und gewogen. Wurde Wildtypmaterial aus den Gewächshäusern verwendet, so kamen nur junge 4-5 cm große Blätter oder Blattspitzen in Frage. Zur Verringerung der Schleimbildung wurde dieses Material vor der Ernte drei Tage dunkel gestellt. Alle weiteren Schritte erfolgten nun im Eisbad oder bei 4°C; außerdem wurden Handschuhe getragen.

Basismedium für die Plastidenisolation war ein von Jensen und Bassham (1966) entwickeltes und von Heber (1973) modifiziertes Medium. Es enthält 0,33 M Sorbit, 2 mM EDTA, 0,5 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$, 10 mM NaCl und 50 mM MES. Der pH-Wert wird mit NaOH bei 4°C auf 6,1 eingestellt.

Zur Isolation von Oenotheraplastiden für die Proteinanalyse wurden einem Liter dieses Basismediums weitere 4 mM EDTA und als Schutzstoffe 2 mM Cystein, 2 mM Natriumascorbat, 0,15% PVP, 5 mM Mercaptoäthanol und 1 mM PMSF zugesetzt und der pH-Wert kontrolliert. Wegen ihrer schnellen Degradation wurden PMSF und Mercaptoäthanol erst kurz vor der Isolation in das Medium gegeben (Pringle, 1975; Gray, 1982). Der Zusatz von PVP ist erforderlich, um Gerbstoffe und Schleime zu binden, die auch in der Gewebekultur von Oenothera bei einigen Wildtypen und Mutanten vorkommen und die Isolation erschweren (Schneider & Hallier, 1970).

Das Blattmaterial wurde je nach Härte 10-20 sec in einem Waring Blendor bei Höchstgeschwindigkeit gemixt. Je nach Schleimgehalt war das Gewichts-/Volumenverhältnis von

Blättern zum Isolationsmedium bis zu 1 : 10. Das Homogenat wurde schnell durch Gaze mit einer Porengröße von 100 µm (Schweizerische Seidengazefabrik, Zürich) gepreßt, um Blatt- und Zellreste abzutrennen. Dieses Vorfiltrat wurde anschließend durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) nochmals filtriert, wobei bei schleimigem Material das Miracloth mehrfach gewechselt wurde. Die Plastiden wurden nun bei 4800 x g (Sorvall-Zentrifuge, HS-4-Rotor) 5-10 min abzentrifugiert und einmal mit dem Isolationsmedium ohne PVP-Zusatz gewaschen. Die Plastiden von 100 g Gewebe wurden in 10 ml Medium aufgenommen und auf sechs Percollgradienten verteilt. Für die Zentrifugation in Silikatgradienten wurden eine 40 und eine 45%-ige Lösung von Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) in Basismedium angesetzt. Dann wurden in 14 ml Zentrifugenröhrchen 2 ml der 45%-igen vorsichtig mit 8 ml der 40%-igen Percollösung überschichtet.

Die Gradienten wurden nach Beladung mit 160.000 x g bei 4°C für 30 min im Schwenkbecherrotor zentrifugiert (SW-40, Beckman Instruments). Dabei entstanden zwei Banden, von denen die obere hauptsächlich gebrochene, die untere, an der Grenze zwischen der 40 und 45%-igen Percollösung, bis zu 90% intakte Plastiden enthält (zur Beurteilung der Intaktheit im Phasenkontrastmikroskop siehe Kahn & von Wettstein, 1961 sowie Schmitt & Herrmann, 1977). Eventuell noch enthaltene Kerne und Mitochondrien sedimentieren zum Boden des Gradienten (zur Reinigung und Auftrennung von Plastiden in Silikatgradienten siehe auch Morgenthaler et al., 1974, 1975). Die beiden Plastidenbanden wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und getrennt weiterverarbeitet.

Zum Entfernen des Percolls wurden die Plastiden zweimal mit Isolationsmedium ohne PVP-Zusatz gewaschen, in wenigen ml desselben Mediums resuspendiert, auf Eppendorfgefäße verteilt und 4 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Plastiden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

3. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

a) Trennung von löslichen und membrangebundenen Proteinen der Plastiden

Gefrorene Plastiden wurden bei Zimmertemperatur schnell aufgetaut, dann aber alle weiteren Arbeitsgänge bei 4°C oder im Eisbad durchgeführt. Es wurden Handschuhe getragen. Zur Organellsuspension wurden sofort 0,1 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 1 mM PMSF gegeben, um die Plastidenhüllen aufzubrechen. Die Fragmentation wurde noch durch vorsichtiges Beschallen im Eisbad mit einem Branson Sonifier (Typ B-12, 2 x 5 sec) mechanisch unterstützt; dabei mußte eine zu große Wärmeentwicklung vermieden werden. Anschliessend wurden in einer Eppendorfzentrifuge die Membranen sedimentiert (4 min), der Überstand, der die löslichen Proteine enthält, in neue Eppendorfgefäße überführt, die Membranen resuspendiert und nochmals mit 0,1 M NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 1 mM PMSF gewaschen. Die löslichen Proteine wurden mit 10% TCA (Endkonzentration) in der Kälte 1 Std. gefällt. Die Membranproteine wurden unter Beschallung in Lösung A resuspendiert (Tabelle III). Bei Membranproteinen von Wildtypmaterial wurde nun der Chlorophyllgehalt bestimmt (Arnon, 1949), auf 1,67 mg Chlorophyll/ml eingestellt und in 100 µl-Portionen in Eppendorfgefäßen bei -70°C eingefroren. Bei der Mehrzahl der Mutanten und den extrem disharmonischen Genom/Plastom-Kombinationen war diese Methode allerdings wegen des vorliegenden Chlorophylldefektes nicht anwendbar. Hier wurde die Proteinkonzentration nach Schaffner und Weissmann (1973) bestimmt, auf 8-9 mg/ml eingestellt und ebenfalls in 100 µl-Portionen in Eppendorfgefäßen bei -70°C eingefroren. Da 100 µg Chlorophyll etwa 500 µg Protein entsprechen (Arnon, 1949), lagen die Wildtyp- und die übrigen Proben in gleicher Ausgangskonzentration vor und konnten auf gleiche Weise behandelt werden.

Tabelle III

Stammlösungen und Lösungen für die Probenaufbereitung (Piccioni et al., 1982)

a) Stammlösungen:

1 M Na_2CO_3*
1 M DTT**
20% SDS (LDS)
60% Saccharose*
1% Bromphenolblau in 50% Glyzerin
50% TCA*
100 mM PMSF*
100 mM Benzamidin*
500 mM ε-Amino Capronsäure*
0,1 M NaCl, 25 mM Tris/HCl, pH 7,5*

* wurden im Kühlschrank aufbewahrt
** wurde in Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt

Aus diesen Stammlösungen wurden unmittelbar vor der Probenaufbereitung folgende Verdünnungen hergestellt:

b) Lösungen zur Probenaufbereitung

Lösung A:

0,1 M Na_2CO_3
0,1 M DTT
1 mM PMSF
1 mM Benzamidin
5 mM ε-Amino-Capronsäure

Lösung B:

5% SDS (LDS)
30% Saccharose
0,1% Bromphenolblau in 50% Glyzerin

b) Vorbereitung der Proben

Für die Gelproben wurden 0,3 ml obiger Membranproteine mit 0,2 ml der Lösung B gemixt (Tabelle III). Dabei ergab sich ein Protein/SDS-Verhältnis von etwa 1 : 4, das für die Denaturierung von Proteinen am besten ist (Reynolds & Tanford, 1970; Helenius & Simons, 1975). Anschließend wurden 20 µl dieses Lysates direkt auf ein Gel aufgetragen oder die Probe vorher 1 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt. Waren die erhitzten oder die nicht erhitzten Proben nicht vollständig klar, wurden sie nochmals 4 min zentrifugiert und für das Gel nur der klare Überstand verwendet.

Lösliche Proteine wurden nach der TCA-Fällung abzentrifugiert und zum Entfernen der restlichen TCA noch zweimal mit 80%-igem Aceton gewaschen, wobei nach dem letzten Waschen das Aceton vorsichtig vollständig abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Proteine in Lösung A aufgenommen und mit einem Mikrospatel oder vorsichtig durch Ultraschall wieder in Lösung gebracht. Die Proteinkonzentration wurde wie oben bestimmt und ebenfalls auf 8-9 mg/ml eingestellt. Die in Lösung A vorliegenden löslichen Proteine wurden mit Lösung B im Verhältnis 3 : 2 gemischt (Tabelle III), 1 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt und je 20 µl auf ein Gel aufgetragen. (Zur Extraktion und Gelprobenaufbereitung siehe auch Delepelaire & Chua, 1979, 1982 sowie Broglie et al., 1980).

c) Elektrophorese

Für die Trennung sowohl der löslichen als auch der membrangebundenen Proteine aus Plastiden wurde das Gel- und Puffersystem von Laemmli (1980) benutzt. Die verwendeten Gelapparaturen entsprachen im Prinzip der von Studier (1973) beschriebenen, nur wurden sie so vergrößert, daß Gele von 30 x 18 cm benutzt werden konnten. Die gesamte verwendete Methodik wurde detailliert von Piccioni et al (1982) beschrieben. Die Proteine wurden

auf Gradientengelen mit 7,5 - 15% Polyacrylamid konzentriert.

Bei der Auftrennung von Immunopräzipitaten wurden Gele mit 15% Polyacrylamid und 2,5 M Harnstoff verwendet. Die Zusammensetzung der Gele und Puffer sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Als Detergenz wurde bei Gelen, die bei 18°C liefen, SDS, bei 4°C LDS verwendet. Die niedrigere Temperatur verdoppelte zwar die Laufzeit der Gele, trug aber zur besseren Auftrennung und größeren Schärfe der Proteinbanden bei. Außerdem wurde die Degradation einiger Chlorophyll/Protein-Komplexe verhindert (Delepelaire & Chua, 1979). Harnstoffgele wurden jedoch grundsätzlich bei 18°C benutzt, da sonst der Harnstoff auskristallisierte. Die Qualität der Auftrennung wurde durch ein Sammelgel mit 5% Polyacrylamid und einem pH-Wert von 6,8 zusätzlich verbessert. Das Prinzip und die Vorzüge einer solchen diskontinuierlichen Gelelektrophorese sind bei Maurer (1968) beschrieben.

Für die Gelelektrophorese wurden grundsätzlich nur p.A.-Chemikalien verwendet und alle Lösungen wie bei Piccioni et al. (1982) beschrieben vorbehandelt.

Tabelle IV

Gelrezepte und Pufferzusammensetzungen zur Auftrennung von Immunopräzipitaten

a) Trenngelpuffer (5-fach konzentriert):

2 M Tris
0,5% SDS
pH 8,8

15%-iges Trenngel mit 2,5 M Harnstoff:

9,6	g Polyacrylamid
153	mg Bisacrylamid
9,6	g Harnstoff
12,8	ml Trenngelpuffer
34,5	ml bidestilliertes Wasser
64	µl TEMED
430	µl 10%-iges Ammoniumpersulfat

b) Sammelgelpuffer (5-fach konzentriert):

0,33 M Tris
0,5% SDS
pH 6,5 (wird mit H_3PO_4 eingestellt)

Sammelgel mit 5 M Harnstoff:

1,0	g Polyacrylamid
16	mg Bisacrylamid
6,0	g Harnstoff
4,0	ml Sammelgelpuffer
20	µl TEMED
180	µl 10%-iges Ammoniumpersulfat
10	ml bidestilliertes Wasser

4. Analyse der Ribulosebisphosphatcarboxylase/ oxygenase

a) Isolation und Reinigung der RuBPcase/oase aus Oenothera

Blattmaterial wurde im Verhältnis 1 : 5 (w/v) in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, mit 200 mM NaCl, 20 mM Natriumascorbat, 5 mM EDTA, 0,1% PVP, 1 mM PMSF und 40 mM Mercaptoäthanol für 30 sec mit Unterbrechungen gemixt, durch 100 µm Gaze gepreßt und anschließend durch zwei Lagen Miracloth filtiert. Das Filtrat wurde in Zentrifugenbechern 2 Std. bei -70°C eingefroren, bei 4°C wieder aufgetaut und 20 min mit 9.000 x g (Sorvall-Zentrifuge, HS-4-Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit etwa zwei Volumina Medium aufgenommen, eingefroren, aufgetaut und erneut abzentrifugiert. Aus den Überständen wurde die RuBPcase/oase mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt (die RuBPcase/oase von Oenothera fällt vollständig erst bei einer Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ von 60%), abzentrifugiert, das Sediment in einem zehnfachen Volumen 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, mit 10 mM Mercaptoäthanol und 0,5 mM EDTA aufgenommen und über Nacht erschöpfend gegen den gleichen Puffer dialysiert. Der nächste Reinigungsschritt erfolgte über eine DEAE-Austauschersäule.

b) Vorbereiten der DEAE-Zellulose-Säule

In 1 l 250 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 5 mM EDTA wurden 50 g DE 52-Zellulose (Whatman) über Nacht gequollen, im Büchner-Trichter abgenutscht und einmal mit dem selben Puffer gewaschen. Das Sediment wurde in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, mit 0,5 mM EDTA und 10 mM Mercaptoäthanol aufgeschwemmt und in eine Säule (20 x 2,5 cm) gefüllt. Anschließend wurde noch eine Stunde mit Puffer gewaschen (Durchflußrate 5 ml/min) und der pH-Wert am Säulenausgang kontrolliert. Sobald der pH-Wert 8,0 erreicht war, konnte die Säule mit dem Dialysat beladen werden. Eluiert wurde mittels eines NaCl-Gradienten

in 25 Fraktionen (500 ml Gradientenvolumen, 0-500 mM NaCl in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0). Anhand des Schreiberprotokolls konnten die enzymhaltigen Fraktionen ermittelt und vereinigt werden. Aus ihnen wurde das Enzym erneut mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt, in 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, mit 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und 10 mM Mercaptoäthanol aufgenommen und gegen diesen Puffer erschöpfend dialysiert. Ein weiterer Reinigungsschritt erfolgte durch Zentrifugation in Saccharosedichtegradienten.

c) Zentrifugation in Saccharosegradienten

Es wurden 10-30% Saccharosegradienten verwendet, die aus einer 10%-igen und einer 30%-igen Saccharoselösung in Puffer (25 mM Tris/Glycin pH 8,7 + 100 mM Mercaptoäthanol) mit einem Gradientenformer (Desaga, Heidelberg) hergestellt wurden. Das eingeengte Dialysat wurde vorsichtig auf die Gradienten aufgetragen (2 ml/Gradient) und im Vertikalrotor (VTi 50, Beckman Instruments) 135 min mit 190.000 x g zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte mit einem ISCO-Gradientenfraktionator mit angeschlossener UV-Optik und Schreiber. Die "Peak"-Fraktionen aller Gradienten wurden vereinigt und mit einer Amiconzelle (Filter 10 XM 100 A, Ausschlußvolumen 100.000; Diaflo Ultrafiltration Membranes, Amicon Corp., Lexington, USA) unter Stickstoff bei 4°C konzentriert.

d) Trennung der Untereinheiten

RuBPcase/oase wurde in die große und die kleine Untereinheit (LSU bzw. SSU) auf präparativen 7,5 - 15%-igen Gelen unter denaturierenden Bedingungen mit SDS aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel mit KCl angefärbt (Hager & Burgess, 1980) kurz entfärbt und die LSU- und die SSU-Bande herausgeschnitten. Eluiert wurde aus dem Polyacrylamid in einem 1%-igen Agarose-Fenstergel (Elektroelution mit 150 V/250 mA, etwa

4 Std; Wienand et al., 1979). Die Eluate wurden wieder mit einer Amiconzelle konzentriert (Filter 10 YM 10, Ausschlußvolumen 10.000), die Proteinkonzentration nach Schaffner und Weismann (1973) bestimmt und auf 2 mg/ml eingestellt. Das Enzym kann so bei -20°C aufbewahrt werden.

5. Immunologie

a) Antikörperherstellung

Zur Erzeugung von Antikörpern gegen die Untereinheiten der RuBPcase/oase wurden Kaninchen nach Standardprozenduren immunisiert (Maurer & Callahan, 1980).

Zur Erzeugung der LSU-Antikörper wurde die gereinigte Probe mit "Freunds Complete Adjuvans" (Difco) 1 : 1 (v/v) versetzt und im Eisbad mit Ultraschall schaumig emulgiert (Mikrospitze, Branson Sonifier).

Zur Erzeugung der SSU-Antikörper wurden die kleinen Untereinheiten vor der Emulgierung zuerst mit Glutaraldehyd partiell vernetzt, um so größere Molekülaggregate zu erhalten (Avrameas, 1969; Reichlin, 1980).

Die Emulsionen wurden den Kaninchen in ca. 20 Depots á 0,1 ml (= 0,1 mg) am Schultergürtel und rechts entlang der Wirbelsäule intracutan gespritzt.

Zur Nachimmunisierung wurden nach einem Monat 0,5 ml intramuskulär in den linken Hinterlauf gespritzt und weitere 20 Depots links entlang der Wirbelsäule intracutan verabreicht. Nach zehn Tagen wurden den Kaninchen je 150 ml Blut durch Herzpunktion entnommen, die Seren hochtourig abzentrifugiert, die Antikörper mit 18% $(NH_4)_2SO_4$ gefällt, gewaschen und mit 0,15 M NaCl + 0,02% Natriumazid rückgelöst und nochmals zentrifugiert. Die klaren IgG-Lösungen wurden in kleinen Portionen bei -20°C aufbewahrt.

b) "Immunotransfer"-Analyse

Die löslichen Plastidenproteine der Wildtypen und Mutanten von Oenothera wurden durch PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (siehe 3.) und auf Nitrocellulosefilter transferiert (Towbin et al, 1979). Nach dem Transfer wurden die Filter mit 1% BSA in 0,14 M NaCl, 5 mM NaH_2PO_4, 5 mM Na_2HPO_4, pH 7,0 (PBS), bei 37°C eine Stunde lang inkubiert, um alle noch freien Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosefilter abzusättigen; überschüssiges BSA wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Die Antikörperinkubation erfolgte bei Zimmertemperatur für mindestens 3 Std. in einer BSA/PBS-Lösung, wobei 10 µl Antiserum pro Proteinbahn eingesetzt wurden. Nicht gebundene Antikörper wurden danach durch mehrfaches Waschen der Filter mit BSA/PBS-Lösung entfernt. Anschließend wurde mit ^{125}I-markiertem Protein A 1 Std. bei 37°C inkubiert. Überschüssiges Protein A und BSA wurden durch einmaliges Waschen mit einer 1%-igen Triton X-100 Lösung mit PBS und vier weiteren Waschschritten nur mit PBS entfernt. Die Filter wurden an der Luft getrocknet, auf Filterpapier (Whatman 3 MM) geklebt, in Haushaltsfolie eingepackt und je nach Aktivität 5-10 Tage bei -70°C autoradiographiert. Danach wurde der Röntgenfilm entwickelt.

c) Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation mit Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I (SAC) erfolgte nach einer von Westhoff und Zetsche (1981) entwickelten Standardprozedur. Die verwendeten Puffer waren:

- Immunisierungspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 600 mM NaCl, 2% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0,02% NaN_3.
- Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,02% NaH_3.
- Denaturierungspuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2,5% SDS, 10% Glyzerin, 0,001% Bromphenolblau.

Als Proteinaseinhibitoren wurde eine Mischung aus jeweils 0,1 M TLCK, TPCK und PMSF gelöst in DMSO verwendet.

Zu den denaturierten Translationsproben wurden je 300 µl Immunisierungspuffer, 264 µl bidestilliertes Wasser, 10 µl SAC-Suspension, 1 µl Vorimmunserum und 6 µl Proteinaseinhibitoren pipettiert, 1 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen und dabei ab und zu durchmischt. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand in neue Eppendorfgefäße übertragen und 1 Std. mit 1-2 µl Antikörper + 5 µl SAC-Suspension/µl Antikörper weiter inkubiert.

Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Sediment dreimal mit Waschpuffer behandelt, in 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, suspendiert, in neue Gefäße übertragen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde 15 min mit Denaturierungspuffer inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Überstände mit 10 µl Mercaptoäthanol versetzt und 2 min auf 70°C erwärmt. Die Proben waren nun für die Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen vorbereitet. Die Immunopräzipitate wurden zumeist in 15%-igen Polyacrylamidgelen mit 2,5 M Harnstoff getrennt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese wie üblich angefärbt und entfärbt, anschließend für 30 min in bidestilliertes Wasser gelegt, für weitere 30 min in einer 16%-igen Natriumsalicylat-Lösung geschüttelt, getrocknet und unter Verwendung von Verstärkerfolien (Quanta III, Du Pont) fluorographiert (Bonner & Laskey, 1974; Chamberlain, 1979).

6. Nucleinsäurenisolation und -Analyse

a) DNA-Isolation aus Plastiden von Oenothera

Zur Isolation wurde ausschließlich Blattmaterial aus der Gewebekultur verwendet und bis zur Lyse der Plastiden im Eisbad oder bei 4°C gearbeitet. Die Plastiden wurden wie unter 2. beschrieben isoliert, jedoch nach der Differentialzentrifugation über Saccharosegradienten gereinigt (10-60% Saccharosegradienten in Basismedium, hergestellt mit dem Desaga Gradientenformer). Die Gradienten wurden in einem SW-40-Schwenkbecherrotor (Beckman Instruments) mit 160.000 x g für 30 min zentrifugiert. Die intakten Plastiden sammelten sich dabei in einer Bande im mittleren Bereich des Gradienten an. Diese Bande wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette in 30 ml-Zentrifugenröhrchen übertragen, so viel einer 30%-igen SDS-Lösung hinzugegeben, daß die Endkonzentration des SDS etwa 3% betrug und, um die Lyse zu beschleunigen, 10 min im Wasserbad auf 50°C erwärmt. Dann wurde die DNA aus dem Lysat mit einem Volumen puffergesättigtem Phenol (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) extrahiert. Dabei wurden die Zentrifugenröhrchen zuerst in Aluminiumfolie eingewickelt, um die Oxydation des Phenols im Licht zu vermeiden, dann 30 min vorsichtig geschüttelt und zur besseren Phasentrennung 10 min mit 16.000 x g im Schwenkbecherrotor (Sorvall-Zentrifuge, HB-4-Rotor) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen abgenommen und die restliche DNA aus der Phenolphase mit einem halben Volumen Puffer in gleicher Weise reextrahiert. Aus den vereinigten wässrigen Phasen wurde das restliche Phenol mit zwei Volumina Chloroform 20 min ausgeschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation getrennt und die wässrige Phase in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Entfernung von RNA und Proteinen wurde 1 Std. bei 37°C mit RNAase (Endkonzentration 10 µg/ml) und anschließend mit Proteinase K (Endkonzentration 10 µg/ml) über Nacht bei Zimmertemperatur inkubiert und die DNA erneut mit Phenol/Chloroform extrahiert.

Die wässrige Phase wurde an der Luft auf 5-10 ml eingeengt und dann erschöpfend gegen 5 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA bei 4°C dialysiert. Danach wurde die Probe erneut eingeengt und die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumina absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde 20 min bei 16.000 x g zentrifugiert und anschließend dreimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA rückgelöst. Zur Gewinnung hochmolekularer Plastiden-DNA wurde die Probe auf einem 0,5%-igen Agarosegel (hochschmelzende Agarose, Seakem ME Marine Colloids Inc.) aufgetrennt (50 mA/50 V für 15 Std.) und die hochmolekulare DNA direkt aus diesem Gel elektroeluiert (150 mA/100 V für 2-4 Std.; McDonnell et al., 1977). Es folgte wiederum eine Phenol/Chloroform-Behandlung, das Einengen der Probe an der Luft, die erschöpfende Dialyse gegen obigen Puffer, die erneute Fällung der DNA mit anschließender Zentrifugation, Waschen und Trocknen und die Wiederaufnahme in 5 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA. Die so gewonnene DNA wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

b) DNA-Isolation aus Plastiden von Spinat

Zu Vergleichszwecken wurde auch DNA aus Spinatplastiden isoliert. Dazu wurde Blattmaterial aus dem Gewächshaus verwendet, das vor der Homogenisation gründlich gewaschen wurde und von dem die Blattstiele entfernt worden waren. Als Homogenisationsmedium diente das zur Isolation von DNA aus höheren Pflanzen entwickelte Medium von Kolodner und Tewari (1975), das für die Isolation von DNA aus Spinatplastiden leicht verändert wurde (Medium B: Herrmann, 1982). Die Isolation der Plastiden, die Entfernung der Kern-DNA, die Lyse der Plastiden und die weiteren Reinigungsschritte der Plastiden-DNA wurden, wie von Herrmann (1982) beschrieben, durchgeführt.

c) "nick-Translation"

Die cDNA wurde im Prinzip nach Rigby et al. (1979) hergestellt, wobei als radioaktive Vorstufe (α-^{32}P)-dCTP verwendet wurde. Der Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Mercaptoäthanol, 50 µg/ml BSA, 5 Einheiten Polymerase I, 20 µM nichtradioaktive Nukleotide, 10 µCurie (α-^{32}P)dCTP und 1-3 µg DNA. Die Reaktion wurde durch Zugabe von kaltem ATP und sofortiger Fällung mit 96%-igem Ethanol bei -80°C terminiert. Das überschüssige ATP wurde anschliessend durch mehrfaches Waschen mit 70%-igem Ethanol entfernt und die DNA in sterilem bidestillierten Wasser rückgelöst und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

d) RNA-Isolation aus Plastiden von Oenothera

Zur RNA-Extraktion wurde stets junges Blattmaterial aus der Gewebekultur verwendet. Alle Gefäße und Geräte wurden vorher UV- oder hitzesterilisiert, alle Medien autoklaviert oder steril filtriert; gearbeitet wurde bei 4°C oder im Eisbad, es wurden grundsätzlich Handschuhe getragen.

Die Plastidenisolation mußte sehr schnell erfolgen, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Das vorgekühlte Blattmaterial wurde 4 sec bei Höchstgeschwindigkeit mit dem Waring Blendor gemixt (Verhältnis Blattmaterial : Isolationsmedium = 1 : 10). Nach dem Abpressen durch 100 µm Gaze wurde schnell durch zwei Lagen Miracloth filtiert. Das Filtrat wurde 5 min mit 7.000 x g (Sorvall-Zentrifuge, HS-4-Rotor) zentrifugiert, die sedimentierten Plastiden einmal mit Waschmedium gewaschen (Isolations- und Waschmedium siehe 2.) und dann bei -20°C eingefroren. Zur RNA-Extraktion wurde zu dem gefrorenen Sediment 10 ml Extraktionsmedium gegeben (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 1% SDS) und anschließend 1 1/2 Volumina mit bidestilliertem

Wasser gesättigtes Phenol. Anschließend wurde 1 1/2 Std. bei 4°C geschüttelt und dann 10 min mit 10.000 x g (Sorvall-Zentrifuge, HB-4-Rotor) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit einem Volumen wassergesättigtem Phenol 45 min geschüttelt und erneut abzentrifugiert. Durch zweimaliges Ausschütteln mit Chloroform wurde das restliche Phenol aus den vereinigten wässrigen Phasen entfernt. Gefällt wurde die RNA über Nacht mit 1/20 Volumen 4 M Natriumacetat pH 5,0 und drei Volumina absoluten Ethanol bei -20°C. Nach dem Zentrifugieren (10 min mit 10.000 x g) wurde das Präzipitat zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, wobei das Ethanol jedesmal möglichst vollständig entfernt wurde. Nach dem Lösen in 80 µl Tris-Boratpuffer (0,08 M Tris, 1 mM EDTA, mit festem H_3BO_3 auf pH 8,3 titriert) wurden 200 µl 4 M LiCl hinzu gegeben und die RNA über Nacht im Eisbad gefällt. Dabei blieben die DNA und die niedermolekularen RNAs in Lösung (Baltimore, 1966; Palmiter, 1973) und konnten durch Zentrifugation von der präzipitierten plastidären RNA abgetrennt werden.

Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Präzipitat dreimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, die RNA in sterilem bidestillierten Wasser im Eisbad rückgelöst, 3 µl davon in 600 µl bidestilliertem Wasser verdünnt im Spektralphotometer (Gilford, Spektrophotometer 250) im Wellenlängenbereich 220-360 nm gemessen und aus den Extinktionen eine Absorptionskurve aufgestellt. Der Kurvenverlauf sowie der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm, der bei 2,0 liegen sollte, ließen auf die Reinheit der RNA schließen. Dann wurde wie folgt die RNA-Menge bestimmt: Extinktion bei 260 nm x 200 (da 3 µl Probe in 600 µl bidestilliertem Wasser verdünnt wurden) x 20 (da die Extinktion von 1,0 etwa 20 µg RNA entspricht) = X µg RNA/ml.

e) Isolation von Gesamtzell-RNA und Trennung der polyadenylierten von der nicht polyadenylierten RNA an Oligo-(dT)-Zellulose

Blattmaterial aus der Gewebekultur wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und auch darin gemörsert, bis es zu einem feinen, trockenen Pulver zerrieben war. Das Pulver wurde in einem Volumen sterilisiertem Lysemedium (5 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2% SDS, 2% Natriumsarkosinat aufgenommen, 1 Volumen Phenol hinzugefügt, das mit Lysemedium gesättigt worden war,und bis zur Emulsionsbildung geschüttelt. Danach wurde ein Volumen Chloroform dazugegeben und erneut 1 Std. bei 4°C geschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert und die wässrige Phase zweimal mit Phenol/Chloroform für 1/2 Std. behandelt. Anschließend wurde die wässrige Phase noch zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt, um das Phenol möglichst vollständig zu entfernen. Die RNA wurde über Nacht mit 1/10 Vol 4 M Natriumacetat + 3 Volumina absolutem Ethanol bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde 20 min bei 10.000 x g sedimentiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Gesamtzell-RNA wurde wie die Plastiden-RNA weiter durch LiCl-Fällung gereinigt (Baltimore, 1966, Palmiter, 1973).

Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA wurden durch Chromatographie über Oligo-(dT)-Zellulose nach der von Covey und Grierson (1976) beschriebenen Methode aufgetrennt. Dabei wurden 40 mg Oligo-(dT)-Zellulose in einem Volumen doppelt konzentriertem Hochsalzpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 300 mM NaCl) eine Stunde bei Zimmertemperatur zusammen mit etwa 600 µg Gesamtzell-RNA geschüttelt, dann in eine Minisäule (Biorad Econocolumns) gefüllt und die Flüssigkeit abgepreßt. Durch Zugabe von 2 1/2 Volumina absolutem Ethanol wurde die Poly(A)$^-$-RNA abgetrennt. Dann wurde mit etwa 20 ml Hochsalzpuffer nachgewaschen und die Flüssigkeit sorgfältig abgepreßt. Durch Zugabe

von 1 ml Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6) und langsames Filtrieren wurde die Poly(A)$^+$-RNA aus der Säule eluiert. Zu diesem Eluat wurden 5 µl Kalbsleber-tRNA sowie 1/20 Volumen 4 M Natriumacetatlösung und 2 1/2 Volumina absolutes Ethanol gegeben und die Poly(A)$^+$-RNA bei -20°C in zwei Tagen gefällt. Die so gefällte RNA wurde 40 min mit 17.000 x g zentrifugiert, dreimal mit 0,1 M Natriumacetat in 70%-igem Ethanol gewaschen, nochmals in Äther aufgenommen, abzentrifugiert und 15 min im Kühlschrank getrocknet. Anschließend konnte die Poly(A)$^+$-RNA in bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden. Die Menge an Poly(A)$^+$-RNA wurde spektralphotometrisch bestimmt (siehe oben).

f) Elektrophorese der RNA in Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen

Es wurde die von McMaster und Carmichael (1977) beschriebene Methode angewandt. Dabei wurden zuerst die plastdären RNAs 30 min mit DNAase vorbehandelt, die Reaktion mit 0,1 M EDTA gestoppt, die RNAs erneut mit LiCl gefällt und anschließend glyoxyliert. Getrennt wurde auf einem 1,2%-igem Agarosegel.

g) Transfer der RNAs auf Nitrocellulosefilter nach Patricia S. Thomas (1980)

Das Agarosegel mit den denaturierten RNAs wurde nach der Elektrophorese auf zwei Lagen Whatman 3MM Papier gelegt, das mit 20 x SSC (3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 6,8) getränkt war. Darauf legte man das ebenfalls mit 20 x SSC equilibrierte Nitrocellulosefilter und weitere zwei Lagen Whatman 3 MM Papier. Das so vorbereitete Gel wurde mit einem ca. 5 cm dicken Stapel von Papierhandtüchern bedeckt und mit einer Glasplatte beschwert. In 15 Std. war die RNA quanti-

tativ auf das Filter übertragen, das nun getrocknet und 2 Std. bei 80°C gebacken wurde, um die Glyoxylierung der RNA rückgängig zu machen und die RNA fest an das Filter zu binden.

h) Hybridisierung mit "nick-translatierter" DNA nach Wahl et al. (1979)

Zur Vorhybridisierung wurde das Nitrocellulosefilter mit 200 µg beschallter Lachsspermien-DNA in 50%-iger Formamidlösung, 5 x SSC, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,5, sowie je 0,02% BSA, PVP und Ficoll (w/v) für 20 Std. bei 42°C inkubiert (Denhardt, 1966). Danach wurde 20 Std. bei 42°C mit der denaturierten "nick-translatierten" DNA-Probe in vier Teilen der obigen Lösung plus einem Teil 50%-igem Dextransulfat, in Folienschlauch eingeschweißt, hybridisiert. Anschließend wurde das Filter viermal mit 2 x SSC + 0,1% SDS bei Zimmertemperatur und noch zweimal mit 0,1 x SSC + 0,1% SDS bei 50°C gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

i) Zellfreie Translation von RNA und DNA

Zur in vitro Translation von RNA wurde das von Pelham und Jackson (1976) entwickelte zellfreie System des nucleasebehandelten Kaninchenreticulozytenlysates benutzt. Ein Translationsansatz bestand aus 8 µl Reticulozytenlysat, 1 µl bidestilliertem Wasser, 1 µl (^{35}S)-Methionin (1 µl ≙ 10µCurie Methionin; spezifische Aktivität > 800 Curie/mMol; Amersham Buchler, Braunschweig) und 1 µl RNA; die Kontrollprobe wurde ohne RNA angesetzt. Translatiert wurde für 1 Std. bei 30°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 µl eines EDTA/RNAase-Gemisches, bestehend aus 2 Teilen 300 ug/ml RNAase + 3 Teilen 100 mM EDTA, und weiterer Inkubation für 15 min, gestoppt. Mit je 1,5 µl einer 20%-igen SDS-Lösung wurden die Translationsprodukte 2 min bei 70°C denaturiert.

Die zellfreie Transkription und Translation der DNA wurde im S 30 System von Escherichia coli nach der Methode von Bottomley und Whitfeld (1979) durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Gewebekultur

Um an Oenothera umfassendere molekularbiologische Untersuchungen auf Protein-, DNA- und RNA-Ebene durchführen zu können, mußte zuerst für die Mutanten und die extrem disharmonischen Genom/Plastom-Artbastarde das Problem der Materialbeschaffung gelöst werden; ein Problem, das durch gärtnerischen Einsatz, nur sehr schwer und im Falle der extrem disharmonischen Artbastarde überhaupt nicht lösbar war. Deshalb sollten hier, aufbauend auf grundlegenden Versuchen von Mehra-Palta in den Jahren 1974/75 (zitiert bei Stubbe & Herrmann, 1982), zuerst weitere Erkenntnisse über das Verhalten der Oenothera Wildtypen, der Genom/Plastom-Artbastarde und der Mutanten in Gewebekultur gesammelt und so das Problem der Materialbeschaffung gelöst werden.

A) Der Einfluß von Hormonen auf die Differenzierung von Organen aus verschiedenen Pflanzenteilen

Entscheidend für die Morphogenese aus pflanzlichem Gewebe in Kulturen ist primär das Zusammenwirken von Auxinen und Cytokininen. Jedoch ist die Reaktion des Ausgangsmaterials, je nach den eingesetzten Mengen und relativen Konzentrationen dieser Hormone, unterschiedlich (Skoog & Miller, 1957; Morre & Key, 1967; Fox, 1969; Thimann, 1972; Fonnesbech, 1972; Engvild, 1972, 1973; Havránek & Novák, 1973; Hess, 1974; Murashige, 1974; Tran Than Van, 1976; Aitchison et al., 1977; Letham et al., 1978; Moore, 1979).

Hier sollte nun untersucht werden, welche Hormone sich am besten zur Induktion einer gezielten Organogenese aus verschiedenen Teilen von Oenotherakeimlingen eignen. Für diese Versuche wurde ausschließlich Oenothera hookeri verwendet, da sich diese Art in Versuchen im Rahmen meiner Staatsexamensarbeit (1976) als das am besten geeignete Ausgangsmaterial erwiesen hatte.

Es wurden 40 verschiedene Medien getestet, die alle auf dem "NT-Medium" basierten. Diesem wurde jeweils das Auxin NAA in Kombination mit einem der vier Cytokinine BAP, IPA, trans- oder "mixed"-Zeatin in unterschiedlichen Mengen zugesetzt (siehe Tabelle V). Auf die mit diesen Medien hergestellten Schrägagarkulturen, wurden die einzelnen Teile von je zwei Keimlingen so abgesetzt, daß sich in einem Kulturröhrchen entweder vier Keimblätter, zwei Vegetationskegelbereiche, zwei Hypokotyle oder zwei Wurzeln befanden. Auf den Röhrchen wurde die Art des Ausgangsgewebes und das verwendete Medium vermerkt, dabei stand "a" für Keimblätter, "b" für Vegetationskegelbereiche, "c" für Hypokotyle und "d" für Wurzeln, sowie die Zahlen 1 - 40 für die einzelnen Medien (siehe Tabelle V). Zum Test eines jeden Mediums wurden pro Versuchsansatz vier Keimlinge verwendet. Die Entwicklung der Kulturen wurde wöchentlich protokolliert.

Eine tabellarische Auswertung erfolgt nach 3 und 6 Wochen. Dabei wurden die Kallusmengen und -farbe, die Anzahl der gebildeten Sprosse, Wurzeln und Pflänzchen sowie deren Farbe beurteilt. Bei der Auswertung ergab sich folgendes:

Auf fast allen Medien (Ausnahmen, siehe Tabellen VI - IX) bildeten sich an den Schnittstellen der Pflanzenteile zuerst kleine Wundkalli ("Ausgangskalli"), aus denen jegliche weitere Differenzierung erfolgte.

I. Differenzierung aus Keimblättern

a) Sproßdifferenzierung

Hier erwies sich generell die Kombination von BAP mit NAA als am besten geeignet, da bei neun verschiedenen Konzentrationsverhältnissen dieser Hormone Sprosse gebildet wurden, während dies bei Verwendung von IPA nur in zwei Fällen, bei Verwendung von trans-Zeatin nur einmal und mit "mixed"-Zeatin überhaupt nicht gelang. Die optimale Sproßbildung, d.h. an allen acht Ausgangskalli, zeigte sich im Medium 6 beim Verhältnis von BAP : NAA = 1 : 5 (mg/l).

Tabelle V: Redifferenzierungsmedien

Verwendete Hormonkombination, deren Konzentrationsverhältnisse und (in Klammern) die Benennung der jeweiligen Medien

Hormonkombination:	BAP/NAA	IPA/NAA	trans-Zeatin/NAA	"mixed"-Zeatin/NAA
Konzentrations-verhältnisse in mg/l	0,5 : 1 (1)	0,5 : 1 (11)	0,5 : 1 (21)	0,5 : 1 (31)
	0,5 : 2 (2)	0,5 : 2 (12)	0,5 : 2 (22)	0,5 : 2 (32)
	1,0 : 2 (3)	1,0 : 2 (13)	1,0 : 2 (23)	1,0 : 2 (33)
	1,0 : 3 (4)	1,0 : 3 (14)	1,0 : 3 (24)	1,0 : 3 (34)
	1,0 : 4 (5)	1,0 : 4 (15)	1,0 : 4 (25)	1,0 : 4 (35)
	1,0 : 5 (6)	1,0 : 5 (16)	1,0 : 5 (26)	1,0 : 5 (36)
	2,0 : 2 (7)	2,0 : 2 (17)	2,0 : 2 (27)	2,0 : 2 (37)
	2,0 : 1 (8)	2,0 : 1 (18)	2,0 : 1 (28)	2,0 : 1 (38)
	1,0 : 0 (9)	1,0 : 0 (19)	1,0 : 0 (29)	1,0 : 0 (39)
	0,5 : 0 (10)	0,5 : 0 (20)	0,5 : 0 (30)	0,5 : 0 (40)

b) Wurzeldifferenzierung

Dafür eignen sich IPA und trans-Zeatin in Kombination mit NAA am besten, da die Medien 11 - 18 sowie 21 - 27 zu starker Wurzelbildung führten. Bei Kombinationen von NAA mit BAP oder "mixed"-Zeatin bildeten sich nur vereinzelt einige kleine Würzelchen.

c) Kallusbildung

Hier erwies sich die Kombination NAA/IPA gegenüber der von NAA/trans-Zeatin als qualitativ überlegen, da auf fünf Medien mit IPA (Medien 11, 13, 14, 17 und 18) jeweils sehr viel grüner bis dunkelgrüner Kallus gebildet wurde, während trans-Zeatin zwar auf acht Medien (21 - 28) sehr viel Kallus erzeugte, dieser sich aber nur in drei Fällen normal grün bis dunkelgrün (Medien 22 - 24) entwickelte, sonst aber braungrün war. Auf drei verschiedenen Medien mit BAP (2, 4 und 6) und zweien mit "mixed"-Zeatin (37 und 38) konnte ebenfalls viel grüner Kallus erzeugt werden.

d) Bildung von kompletten Pflänzchen

Die Erzeugung von Pflänzchen gelang fast ausschließlich bei Verwendung von BAP in Verbindung mit NAA (Medien 3 - 6), wobei Medium 6 in allen acht Ausgangskalli zu bewurzelten Sprossen führte. IPA und trans-Zeatin resultieren nur in drei Fällen (Medien 12 und 15 bzw. 24) in der vereinzelten Bildung ganzer Pflänzchen.

Allgemein erwiesen sich also die Kombinationen von NAA mit BAP für die Sproßbildung als am besten geeignet, die mit IPA für die Wurzel- und Kallusbildung und für die Erzeugung ganzer Pflänzchen speziell Medium 6 (BAP : NAA = 1 : 5 mg/l). Das "mixed"-Zeatin war für jegliche Differenzierung schlechter geeignet und der Verzicht auf NAA in einzelnen Medien verhinderte generell eine Differenzierung (Tabelle VI; Abb. 1).

II. Differenzierung aus Vegetationskegelbereichen

a) Sproßdifferenzierung

Die Vegetationskegelbereiche wuchsen auf allen vier Medien weiter, wobei vielfach multiple Sproßbildung auftrat. Bei der Verwendung von "mixed"-Zeatin, aber waren die gebildeten Sprosse meistens weißlich und klein, während sie sonst eine grüne bis dunkelgrüne Farbe hatten und teilweise über zwei cm groß wurden.

b) Wurzeldifferenzierung

Dabei zeigten sich wieder NAA/IPA und NAA/trans-Zeatin als wirkungsvollste Hormonkombinationen, da sowohl auf den Medien 11 - 18 als auch auf den Medien 21 - 27 jeweils viele Wurzeln erzeugt wurden. Nur in drei Fällen führte "mixed"-Zeatin (Medien 35, 37 und 39) zu starker Bewurzelung. Auf allen NAA/BAP-Kombinationen zeigte sich generell nur geringere Bewurzelung.

c) Kallusbildung

Es wurde jeweils sehr viel grüner bis dunkelgrüner Kallus bei Verwendung von BAP auf den Medien 1, 2, 6, 7 und 10, mit IPA auf den Medien 11, 13 und 14, mit trans-Zeatin auf den Medien 21 - 24 und mit "mixed"-Zeatin auf dem Medium 37 gebildet. In allen anderen Fällen war der Kallus meist bräunlich oder gelb und zum Teil weniger groß ausgebildet. Besonders die Verwendung von "mixed"-Zeatin führte in den meisten Fällen zu andersartig gefärbten Kalli, d.h. die Chlorophyllsynthese war gehemmt, so daß andere Farbstoffe wie Carotinoide und Anthocyane sichtbar wurden.

d) Bildung von kompletten Pflänzchen

Sowohl mit BAP auf den Medien 1 - 6 als auch mit IPA auf den Medien 11 - 18 und mit trans-Zeatin auf den Medien 21 - 27 konnten in Verbindung mit NAA bewurzelte, grüne

Sprosse erzielt werden. Hingegen führte "mixed"-Zeatin nur vereinzelt zur Bildung von kleinen weißlichen Pflänzchen. Hier zeigt sich deutlich das starke Redifferenzierungsvermögen der Vegetationskegelbereiche, da unabhängig von den eingesetzten Hormonen, wieder ganze Pflänzchen gebildet wurden. Selbst das Weglassen des Auxins NAA führte zu keiner deutlichen Beeinträchtigung dieser Fähigkeit. Einzig "mixed"-Zeatin scheint auch hier eher einen hemmenden Einfluß zu haben (Tabelle VII, Abb. 2).

III. Differenzierung aus Hypokotylen

a) Sproßdifferenzierung

Aus Hypokotylen wurde nur vereinzelt Sproßbildung beobachtet und zwar nur bei Verwendung von NAA mit IPA oder trans-Zeatin auf den Medien 13, 15 und 16 bzw. 21 - 24 und 26 - 28. Die BAP oder "mixed"-Zeatin enthaltenden Medien führten generell nicht zur Sproßdifferenzierung.

b) Wurzeldifferenzierung

Es bildeten sich nur in wenigen Fällen Wurzeln aus, wobei die Kombination von NAA mit IPA noch am geeignetsten erschien.

c) Kallusbildung

Der meiste grün bis dunkelgrüne Kallus wurde mit IPA/NAA auf den Medien 21 - 28 sowie mit trans-Zeatin auf den Medien 31 - 37 gebildet. BAP/NAA führte zwar ebenfalls zu viel Kallus, nur war der zumeist gelblich oder braun, was auf eine gestörte Chlorophyllsynthese hindeutete. Mit "mixed"-Zeatin konnten aus dem selben Grunde nur kleine, meist gelbe Kalli erzielt werden.

d) Bildung von kompletten Pflänzchen

Wie schon aus der Differenzierung einzelner Sprosse und Wurzeln zu ersehen ist, ist die Erzeugung ganzer Pflänzchen, bei der Verwendung von Hypokotylen als Ausgangsmaterial, sehr stark herabgesetzt. Und tatsächlich gelang es nur in drei Fällen beim Einsatz von NAA mit IPA (Medien 13, 15 und 16), in vier Fällen mit trans-Zeatin (Medien 21, 24, 26 und 27) und in einem Fall mit "mixed"-Zeatin (Medium 37) einzelne bewurzelte Sprosse zu erzielen. Diese waren aber in jedem Fall kleiner als die aus Keimblättern oder Vegetationskegelbereichen erhaltenen Pflänzchen. Insgesamt zeigte sich, daß bei Verwendung von Hypokotylen zwar in den meisten Fällen eine Kallusbildung noch angeregt werden konnte, die bei Verwendung von IPA oder trans-Zeatin auch noch zu großen grünen Kalli führte, die Differenzierung von Wurzeln jedoch stark und die von Sprossen oder ganzen Pflänzchen fast komplett gehemmt war. Generell als schlecht erwiesen sich hier BAP und "mixed"-Zeatin, sowie alle Medien in denen NAA fehlte, auf denen es zu keinerlei Differenzierung kam (Tabelle VIII; Abb. 3).

IV. Differenzierung aus Wurzeln

a) Sproßdifferenzierung

Sprosse wurden auf keinem der Medien ausgebildet.

b) Wurzeldifferenzierung

Es wurden sowohl auf Medien mit BAP (2 und 4) als auch mit IPA (12 - 16) viele, mit trans-Zeatin nur wenige (22 - 28) und mit "mixed"-Zeatin und auf allen übrigen Medien, auch wenn sie NAA enthielten, keine Wurzeln erzeugt.

c) Kallusbildung

Die Kallusbildung war am besten bei Verwendung von NAA mit IPA, das auf den Medien 11 - 16 zu großen grünen bis dunkelgrünen Kalli führte; ähnlich gut war die Kombination NAA/ trans-Zeatin in den Medien 22 - 24 und 27. BAP führte nur vereinzelt zu großen grünen, meist aber nur zu braunen Kalli. Mit "mixed"-Zeatin ließ sich überhaupt nur wenig bräunlich bis schwarzes Kallusgewebe erzielen, d.h. das gebildete Gewebe starb sehr schnell ab.

d) Bildung von kompletten Pflänzchen

Mangels Sproßbildung konnten sich auch keine ganzen Pflänzchen entwickeln. Differenzierungsversuche aus Wurzeln zeigten in noch stärkerem Maße als die aus Hypokotylen, daß aus derartigen Geweben, unter den hier gewählten Bedingungen jegliche Morphogenese erschwert, ja fast unmöglich ist. Auch sonst optimale Hormonkombinationen können diese Hemmung nicht aufheben (Tabelle IX; Abb. 4).

Zusammenfassend stellte sich bei diesem Versuch heraus, daß Vegetationskegelbereiche und fast ebensogut Keimblätter zur Induzierung einer gezielten Morphogenese das am besten geeignete Material sind. Für die Differenzierung ganzer Pflänzchen sind Kombinationen von BAP mit NAA in den Verhältnissen 1 : 2 bis 1 : 5 am besten, während Wurzeln und Kallus leichter durch Kombinationen von IPA mit NAA oder trans-Zeatin mit NAA zu erzeugen sind. Das Auxin NAA ist in jedem Fall für die Differenzierung notwendig. Von den vier untersuchten Cytokininen ist "mixed"-Zeatin zumindest für Oenothera hookeri, zur Induktion jeglicher Morphogenese kaum geeignet.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zur gezielten Morphogenese aus verschiedenen Gewebeteilen von Keimlingen von Oenothera hookeri wurden während mehrerer Jahre mehrfach wiederholt. Dabei wurde allerdings auf das "mixed"-Zeatin und die Medien ohne NAA verzichtet. Die erste Auswertung erfolgte ebenfalls nach drei Wochen, wurde aber durch eine zweite nach sechs Wochen ergänzt. Dabei zeigte sich zwar, das IPA und trans-Zeatin nach längerer Einwirkung auf das Gewebe zu einer verbesserten Sproßbildung führten, aber die Wirkung von BAP in keinem Fall erreichten.

Zum besseren Überblick wurden die Ergebnisse aller Versuche in den vier folgenden Tabellen sowie den Abbildungen 1 - 4 zusammengefaßt:

Tabelle VI: Vergleich der Differenzierung aus Keimlingen von Oenothera hookeri auf "NT-Medium" bei Zugabe verschiedener Hormonkombinationen

Gesamtauswertung
Verwendeter Pflanzenteil: Keimblätter (a)

Hormonkombinationen:		BAP/NAA			IPA/NAA			trans-Zeatin/NAA			"mixed"-Zeatin NAA		
Konzentrations-verhältnisse (mg/l)	Diff. Gewebe:	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus
0,5 : 1		± hg	± w	± bg	-	+ w	+ g	± g	± w	++ g	-	-	+ bg
0.5 : 2		+ g	± w	+ g	-	++ w	± g	± g	± w	++ g	-	+ b	+ bg
1,0 : 2		+ hg	± w	+ bg	+ dg	++ w	+ g	± dg	+ w	++ g	-	-	+ hg
1,0 : 3		+ hg dg	+ w	++ bg	± dg	++ w	+ g	+ g	++ w	++ g	-	-	+ q
1,0 : 4		++ g	++ w	++ g	± g	++ w	+ g	± g	++ w	++ g bg	-	-	+ hg
1,0 : 5		++ hg dg	+ w	++ g hg	-	++ w	+ g	± g	++ w	++ g bg	-	+ b	+ gb
2,0 : 2		+ hg	-	++ bg	-	++ w	++ g	+ hg	+ w	++ bg	+ hg	++ b	++ hg
2,0 : 1		+ hg g	-	++ gb	-	-	+ bg	-	-	+ bg	-	-	+ g hg
1,0 : 0		-	-	-	-	-	-	-	-	+ bg	-	-	+ bg
0.5 : 0		± w	-	-	-	-	-	-	-	+ gb	-	-	+ bg

Verwendete Symbole: - = nicht gebildet
± = gebildet
+ = gut entwickelt
++ = sehr gut entwickelt

Farben: w = weiß
hg = hellgrün
g = grün
dg = dunkelgrün
b = braun
gb = gelbbraun
bg = braungrün
rhg = rötlich bis hellgrün
r = rot

Tabelle VII: Vergleich der Differenzierung aus Keimlingen von Oenothera hookeri auf "MT-Medium" bei Zugabe verschiedener Hormonkombinationen

Gesamtauswertung
Verwendeter Pflanzenteil: Vegetationskegel (b)

Hormonkombinationen:		BAP/NAA			IPA/NAA			trans-Zeatin/NAA			"mixed"-Zeatin/NAA		
Konzentrations-verhältnisse (mg/l)	Diff. Gewebe:	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus
0.5 : 1		++ hg	+ w	+ g	++ dg	+ w	++ g dg	++ dg	++ w	+ g	+ dg hg	+ w	+ bg
0.5 : 2		++ hg g	-	+ g	++ g dg	++ w	+ g	++ g	+ w	+ g dg	+ hg	-	+ bg r
1,0 : 2		+ hg	+ w	+ g	+ g	++ w	++ g	+ dg	+ hg	++ g	+ hg	-	++ rhg bg
1.0 : 3		++ hg	+ w	+ bg	+ g	++ w	++ g dg	++ g hg	++ w	++ g	++ hg	+ w	++ hg g
1,0 : 4		++ hg	+ w	+ bg	++ g	++ w	++ g	++ g	++ w	+ bg	++ hg	++ w	++ hg bg
1,0 : 5		++ hg	+ w	+ g	++ g	++ w	++ g	++ dg hg	++ hg	++ g	++ dg	+ w	++ hg bg
2,0 : 2		++ hg	-	+ g	++ hg dg	++ w	++ g bg	+ hg	++ w	++ g	++ hg	+ w	++ g bg
2,0 : 1		++ hg	-	-	++ g	++ w	+ bg	+ hg	-	++ bg	+ hg	-	++ bg
1,0 : 0		++ hg	-	+ bg	+ hg	+ w	+ g	++ hg	-	+ bg	++ hg	+ w	-
0.5 : 0		++ hg	-	++ g	+ g hg	+ w	+ g	+ hg	-	-	++ hg	-	-

Verwendete Symbole siehe Tabelle VI.

Tabelle VIII: Vergleich der Differenzierung aus Keimlingen von Oenothera hookeri auf "NT-Medium" bei Zugabe verschiedener Hormonkombinationen

Gesamtauswertung
Verwendeter Pflanzenteil: Hypokotyl (c)

Hormonkombinationen:		BAP/NAA			IPA/NAA			trans-Zeatin/NAA			"mixed"-Zeatin/NAA		
Konzentrationsverhältnisse (mg/l)	Diff. Gewebe:	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus
0.5 : 1		-	-	+ g bg	-	± w	++ g	± hg	± w	++ g	-	-	+ bg
0.5 : 2		± hg	-	+ g b	-	± w	++ dg g	± dg	-	++ dg	-	-	++ hg bg
1,0 : 2		-	-	± b	± hg bg	± w	+ g	± dg	± w	++ dg	-	-	+ g bg
1,0 : 3		-	-	++ bg	-	± w	++ g	+ g	± w	++ g	± g	-	+ hg
1,0 : 4		+ hg g	± w	++ gb dg	± hg g	± w	++ dg	± g	+ w	++ g	-	-	+ hg
1,0 : 5		± g	-	+ bg g	± dg g	++ w	++ dg	++ dg	+ w	++ g	-	-	+ bg
2,0 : 2		-	-	+ bg r	-	± w	++ g	+ dg hg	± w	++ dg	-	-	++ bg
2,0 : 1		-	-	+ bg	± hg	-	+ dg bg hg	+ hg dg	-	++ bg	-	-	++ bg
1,0 : 0		-	-	± rhg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5 : 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Verwendete Symbole siehe Tabelle VI.

Tabelle IX: Vergleich der Differenzierung aus Keimlingen von Oenothera hookeri auf "NT-Medium" bei Zugabe verschiedener Hormonkombinationen

Gesamtauswertung
Verwendeter Pflanzentoil: Wurzeln (d)

Hormonkombinationen:			BAP/NAA			IPA/NAA			trans-Zeatin/NAA			"mixed"-Zeatin/NAA		
Konzentrations-verhältnisse (mg/l)	Diff. Gewebe:	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus	Sprosse	Wurzeln	Kallus
0.5 : 1		-	-	+ bg	-	± w	+ dg	-	-	++ bg	-	-	+ bg
0.5 : 2		-	± w	++ b g	-	+ w	++ g	-	± w	++ dg	-	-	+ bg
1,0 : 2		-	± w	+ bg	-	± w	++ g	-	± w	++ dg	-	-	+ bg
1,0 : 3		-	± w	+ bg	-	± w	++ dg g	-	± w	++ g dg	-	-	± hg g
1,0 : 4		-	± w	++ bg g	+ dg g	± w	++ dg bg g	-	± w	++ bg dg	-	-	+ bg
1,0 : 5		-	-	++ hg b	-	++ w	++ dg	-	± w	++ bg dg	-	-	-
2,0 : 2		-	-	++ bg g	-	-	++ bg	-	-	++ g	-	-	++ bg
2,0 : 1		-	-	+ b	-	-	++ bg	-	-	+ bg	-	-	+ bg
1,0 : 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5 : 0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Verwendete Symbole siehe Tabelle VI.

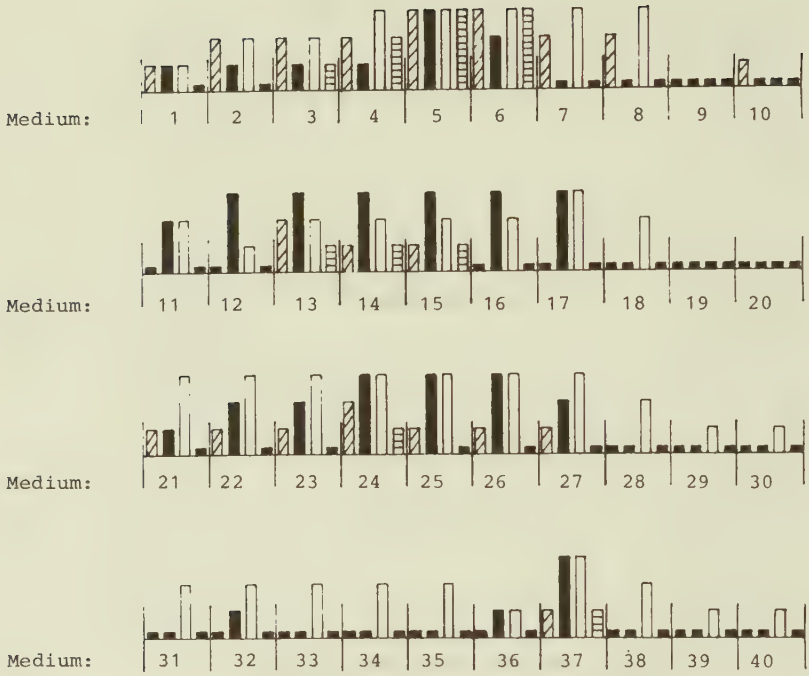

Abb. 1: Differenzierung aus Keimblättern

Zeichenerklärung

Art der Differenzierung: = Sprosse; = Wurzeln; = Kallus; = ganze Pflänzchen

= keine; = wenig; = viel; = sehr viel

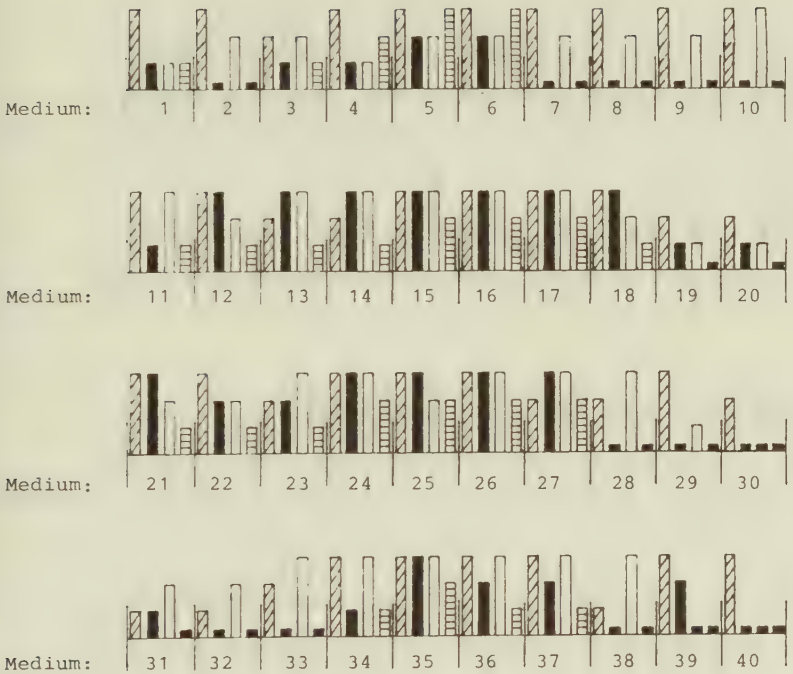

Abb. 2: Differenzierung aus Vegetationskegeln

Zeichenerklärung

Art der Differenzierung: = Sprosse; = Wurzeln; = Kallus; = ganze Pflänzchen

= keine; = wenig; = viel; = sehr viel

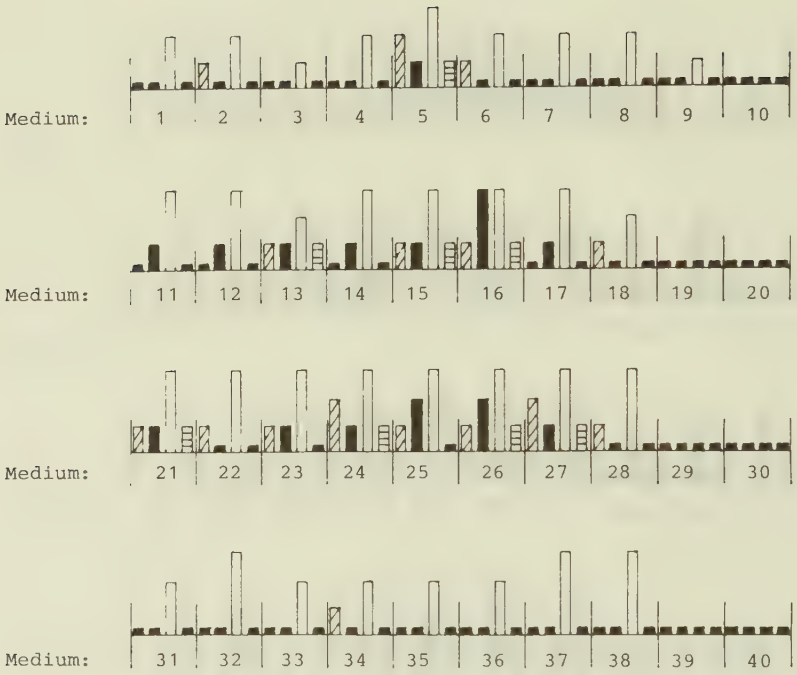

Abb. 3: Differenzierung aus Hypokotylen

Zeichenerklärung

Art der Differenzierung: = Sprosse; = Wurzeln; = Kallus; = ganze Pflänzchen

= keine; = wenig; = viel; = sehr viel

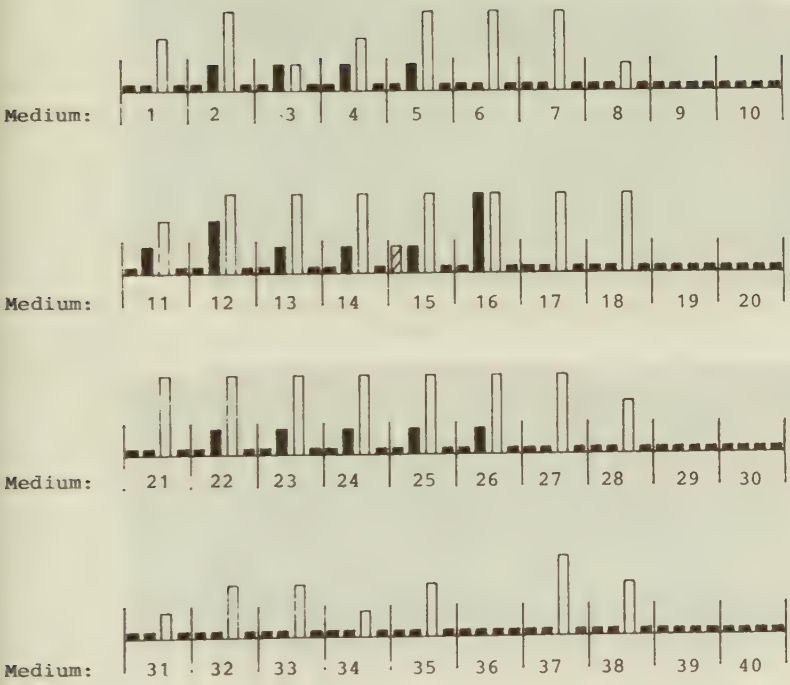

Abb. 4: Differenzierung aus Wurzeln

Zeichenerklärung

Art der Differenzierung: = Sprosse; = Wurzeln; = Kallus; = ganze Pflänzchen

= keine; = wenig; = viel; = sehr viel

Die Abbildungen 5 - 13 zeigen typische Beispiele für den Einfluß von Hormonen auf die Differenzierung von Organen aus verschiedenen Pflanzenteilen.

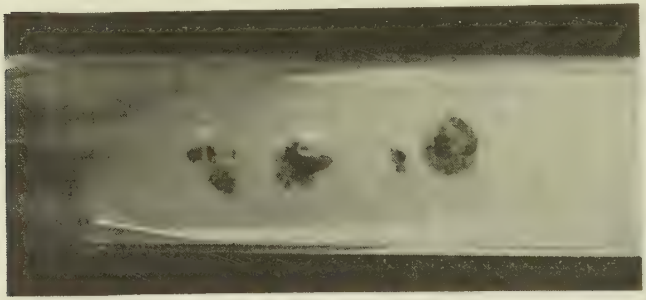

Abb. 5: Die Bildung von Wundkallus und beginnende Wurzelbildung an Keimblättern

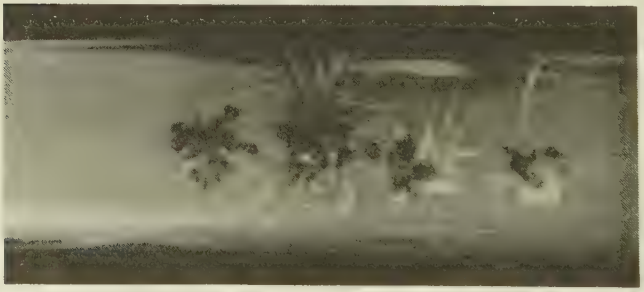

Abb. 6: Verstärkte Kallus- und Wurzelbildung aus Keimblättern auf Medium 16 (IPA:NAA=1:5)

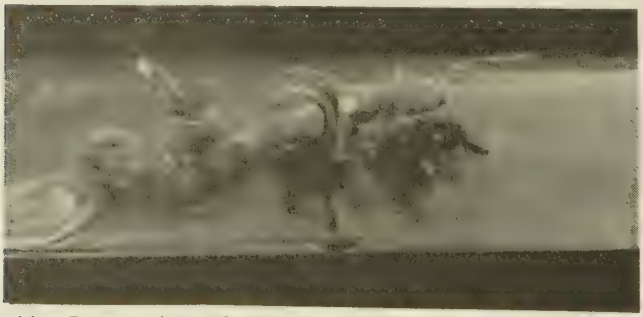

Abb. 7: Beginnende Kallus und Sproßbildung aus Keimblättern auf Medium 4 (BAP:NAA=1:3)

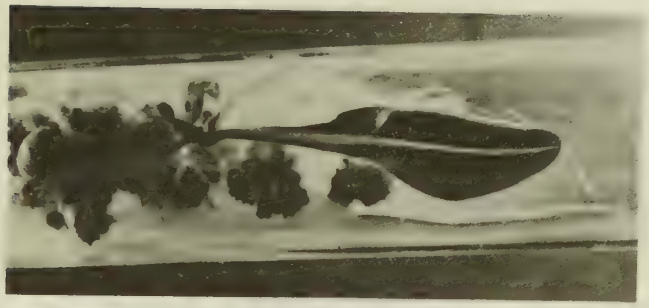

Abb. 8: Blatt-, Sproß-, Wurzel- und Kallusbildung nach längerer Kultur auf Medium 25 (trans-Zeatin:NAA=1:4)

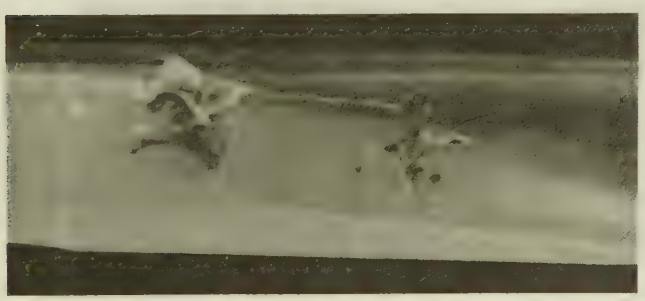

Abb.9: Entwicklung ganzer Pflänzchen aus Vegatationskegeln auf Medium 10 (BAP:NAA=0,5:0)

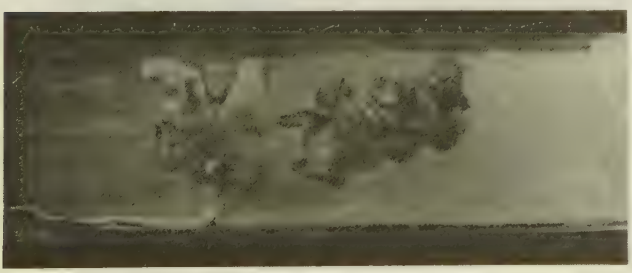

Abb. 10: Entwicklung von Kallus und vielen Sprossen aus Vegetationskegeln auf Medium 2 (BAP:NAA=0,5:2)

Abb. 11: Kallusbildung und beginnende Wurzeldifferenzierung aus Hypokotylstücken auf Medium 14 (IPA:NAA=1:3)

Abb. 12: Kallus- und Sproßbildung aus Hypokotylstücken auf Medium 2 (BAP:NAA=0,5:2)

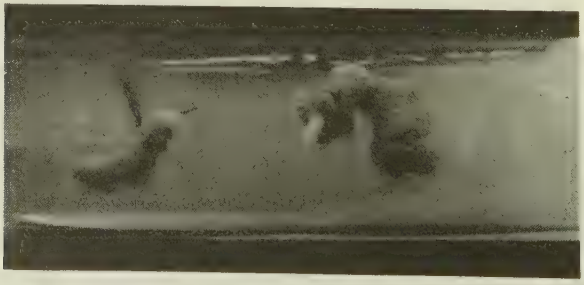

Abb. 13: Kallus- und Wurzelbildung an Wurzeln auf Medium 5 (BAP:NAA=1:4)

B. Versuche zur Aufhebung der Differenzierungshemmung von 2,4-D nach längerer Einwirkung auf Kallus aus Gewebe von Oenothera hookeri

Die differenzierungshemmende Wirkung von 2,4-D auf Gewebe aus zweikeimblättrigen Pflanzen ist seit langem bekannt und wird von vielen Autoren beschrieben (Binding; 1971; Fonnesbech, 1972; Engvild, 1972 und 1973; Donn et al., 1973; Messerschmidt, 1974). Die gleichen Autoren waren es auch, denen es durch geeignete Hormonzugaben gelang, Kallus der nach Einfluß von 2,4-D aus den Geweben einzelner Pflanzenarten erzeugt worden war, wieder zur Morphogenese anzuregen. Allerdings gelang dies in allen Fällen nur wenn 2,4-D kürzere Zeit eingewirkt hatte.

In Vorversuchen war es bei Oenothera bisher gelungen, den hemmenden Einfluß von 2,4-D auf Kallus aus Keimblättern und Vegetationskegelbereichen noch nach vierwöchigem Einwirken, durch mehrfaches Umsetzen auf 2,4-D-freies Medium und Zugabe von NAA und BAP, aufzuheben und Sproß- und Wurzelbildung zu induzieren (Hildebrandt, 1976). Die Frage war nun, ob man auch nach längerem Einfluß von 2,4-D, wieder Sproßbildung erzielen und somit die Voraussetzung zur Bildung ganzer Pflanzen schaffen konnte? Denn durch längere Kultur auf 2,4-D Medium kann man große Mengen Kallus erzeugen, aus dem man dann entsprechend viele Pflanzen redifferenzieren könnte.

I. Redifferenzierung von ganzen Pflanzen aus Kallus nach längerem Einfluß von 2,4-D

Aufbauend auf die Ergebnisse aus Teil A, wurden zur Kallusbildung als Ausgangsgewebe nur Keimblätter und Vegetationskegelbereiche verwendet, sowie die Hormonkombination von NAA mit BAP. Als Grundmedium diente wieder das "NT-Medium" (Tabelle II).

Zunächst wurden Keimblätter und Vegetationskegelbereiche auf Schrägagarkulturen unter Normalbedingungen auf "NT-Medium" gehalten, das 1 mg/l BAP und 3 mg/l NAA enthielt. Nach vier Wochen hatten sich auf allen Ausgangsgeweben viele Sprosse und Wurzeln sowie viel grüner Kallus gebildet. Von diesen Kalli wurden nun kleine Stücke auf zwei Medien abgesetzt, die die gleichen Mengen an BAP und NAA wie zuvor enthielten, von denen das eine aber zusätzlich 0,25 mg/l und das andere 0,1 mg/l 2,4-D enthielt. Die Kallusteile wurden sechs Wochen auf diesen Medien weiter kultiviert, was zur Bildung großer dunkelgrüner Kalli führte, ohne daß jedoch noch weitere Sprosse oder Wurzeln ausdifferenzierten. Um nun erneute Sproßdifferenzierung zu induzieren, wurden Teile dieser Kalli wieder auf das Ausgangsmedium ohne 2,4-D abgesetzt; parallel dazu wurden aber auch Medien mit nur 1 mg/l BAP oder ganz ohne Hormonzusätze verwendet. Dieser gesamte Ansatz wurde als Subkultur "S 1" bezeichnet.

Nach zehn Tagen entwickelten sich aus allen Kalli, die auf das Ausgangsmedium mit BAP und NAA transferiert worden waren, mehrere bis zu 0,5 cm lange Wurzeln und vereinzelt sogar schon Sproßknospen. Nach zwanzig Tagen war die Wurzelbildung verstärkt und in einem Fall hatten sich aus den Sproßknospen bereits die ersten Blattsprosse gebildet, aus denen sich im weiteren Verlauf der Kultur größere Blätter entwickelten.

Kalli, die auf Medien mit 1 mg/l BAP oder auf hormonfreies Medium abgesetzt worden waren, zeigten nach zehn Tagen noch keinerlei Differenzierungsansätze. Deshalb wurden sie genau wie die auf dem Medium mit 1 mg/l BAP + 3 mg/l NAA noch nicht weiterentwickelten Kallusteile auf frische Medien umgesetzt (Subkultur "S 2"). Dieser Transfer wurde alle zehn Tage wiederholt ("S 3", "S 4" usw), um so durch "Ausdünnen" des 2,4-D die Kalli möglichst schnell dem Einfluß des Wuchsstoffes zu entziehen.

Während die Kalli auf dem Medium mit BAP und dem ohne Hormone kaum weiter wuchsen, keinerlei Differenzierungsansätze zeigten und schließlich abstarben, kam es in der Subkultur "S 4" auf dem Medium mit BAP und NAA erneut zur Bildung von Wurzeln und Sproßknospen, die sich zum Teil zu Blattsprossen und schließlich zu richtigen Blättern entwickelten.

Für die Sproßbildung spielte es dabei keine Rolle, ob das Ausgangsmaterial Keimblätter oder Vegetationskegelbereiche waren oder ob der Kallus vorher auf Medium mit 0,25 oder 0,1 mg/l 2,4-D weitergewachsen war.

Das Ziel jedoch, ganze Pflanzen zu regenerieren, gelang allerdings in keinem Fall direkt aus Kallus, da die Sproß- und Wurzelbildung ungewöhnlicherweise an verschiedenen Stellen der Kalli auftrat (Abb. 14). Deshalb wurde ein Teil der erzeugten Blattsprosse auf ein Medium gesetzt, das nur 2 mg/l NAA enthielt. Daraufhin entwickelte sich schon nach kurzer Zeit ein kräftiges Wurzelwerk, das es ermöglichte, die so entstandenen Pflänzchen nach Abhärtung auf Erde abzusetzen und im Gewächshaus weiter zu kultivieren. Dort wuchsen sie sehr gut weiter, entwickelten auch Blütenstände und waren nicht von den aus Samen gezogenen Pflanzen zu unterscheiden. Ein Teil dieser Pflänzchen wurde, nachdem sie in der Erde gut angewachsen waren, sogar auf das Feld ausgepflanzt und entwickelte sich auch dort ganz normal.

Zur Überprüfung der Fertilität wurden an diesen Pflanzen im Gewächshaus und auf dem Feld Selbstungen durchgeführt. Das erhaltene Saatgut keimte im folgenden Frühjahr sowohl auf Agar als auch auf Erde im Gewächshaus und entwickelte sich ebenfalls zu ganz normalen Pflanzen. Es wurde dabei nur ein einziger veränderter Blütenstand an einer Pflanze beobachtet, der auf eine höhere Ploidiestufe schließen ließ, was gelegentlich auch in normalen Kreuzungsexperimenten zu beobachten ist (persönliche Mitteilung von Prof. Stubbe).

Beispiele zur Redifferenzierung nach längerem 2,4-D-Einwirken

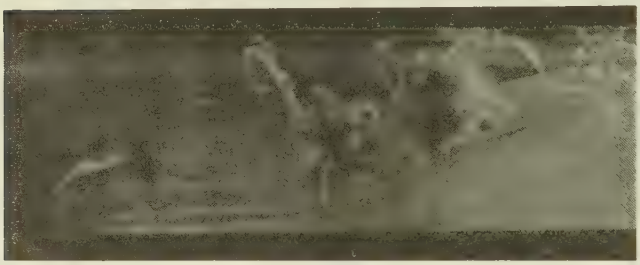

Abb. 14: Getrennte Sproß- und Wurzelbildung bei der Redifferenzierung aus Kallus nach längerer 2,4-D-Einwirkung

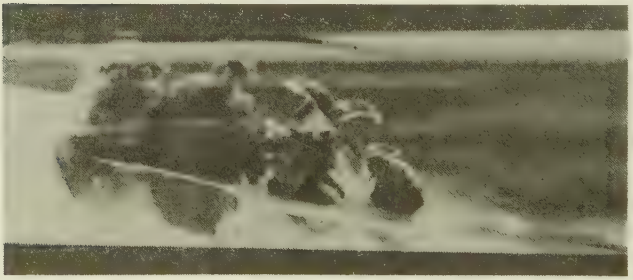

Abb. 15: Sproßdifferenzierung aus Kallus nach der sechsten Subkultur auf 2,4-D-freiem Medium (BAP:NAA=1:3)

Die Regeneration ganzer Pflanzen aus Kallus gelang im weiteren noch, wenn dieser nach zwölf Wochen von dem 2,4-D-Medium auf Medien mit BAP und NAA umgesetzt wurde. Allerdings waren dann sechs Subkulturen auf 2,4-D-freiem Medium notwendig, um wieder Sproßbildung zu erhalten (Abb. 15). Versuche, nach noch längerem Einwirken von 2,4-D, Pflanzen zu regenerieren, gelangen jedoch auch nach zehn Subkulturen nicht mehr.

II. Versuche zur Redifferenzierung ganzer Pflanzen aus Kallus, der mehr als drei Jahre unter dem Einfluß von 2,4-D stand

Parallel zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Serie wurde der Versuch unternommen, Kalluskulturen einiger Mutanten, die zum Teil schon mehr als drei Jahre auf 2,4-D-haltigen Medien gewachsen waren, zur Redifferenzierung anzuregen. Alle diese Kulturen waren 1975 auf dem "NT-Medium" angelegt worden, das als Hormonzusätze 0,5 mg/l BAP und 0,25 mg/l 2,4-D enthielt. Da sich der Kallus auf diesem Medium in einigen Fällen schlecht entwickelte, wurden Teile davon Anfang 1976 auf Medien transferiert, die andere Konzentrationen von BAP oder 2,4-D hatten oder zusätzlich NAA enthielten. Außerdem wurde Kallus von einer Mutante wieder auf Medien ohne 2,4-D abgesetzt (siehe Tabelle X).

Tabelle X:
Kalluskulturmedien vor Beginn der Redifferenzierungsversuche

Medium	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	2,4-D (mg/l)
1*	0,5	-	0,25
2	0,5	0,5	0,10
3**	1,0	3,0	-
4**	1,0	4,0	-
5	0,5	-	0,10

* Dieses Medium war das Ausgangsmedium

** Kallus der Mutante II beta, der schon 1976 auf diese Medien umgesetzt worden war, zeigt bis heute keine Redifferenzierung

Als Ausgangsmaterial für diese Redifferenzierungsversuche wählte ich Anfang 1979 Kallus von Mutanten aus, der teilweise auf mehreren Medien erhalten worden war (siehe Klammer hinter der jeweiligen Mutantenbezeichnung): I beta (2), I gamma (1), I ny (1,2), I xi (1, 2, 5), I sigma (1), II beta (1); II gamma (1, 2); II eta (1), III beta (1), III gamma (1, 2), IV beta (2,5).

Wie bei der ersten Versuchsreihe wurde zunächst getestet, ob sich durch mehrfaches Subkultivieren auf 2,4-D-freiem Medium, dessen differenzierungshemmende Wirkung aufheben ließ. Parallel dazu wurden Teile von jedem Kallus nicht nur auf das gleiche Medium ohne 2,4-D abgesetzt, sondern zusätzlich auf alle anderen Medien (natürlich jetzt ebenfalls ohne 2,4-D), so daß ein Teil von jedem Kallus schließlich parallel auf fünf verschiedenen Medien ohne 2,4-D wuchs. Außerdem wurde der Gesamtansatz geteilt und bei 18 und 23°C aber unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert. Außer der Bildung einiger Adventivwürzelchen in der ersten Subkultur, die aber bald schon wieder verschwanden, konnte keinerlei Differenzierung beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich, daß der Kallus auf den Medien 1, 2 und 5 ohne 2,4-D, im Laufe mehrerer Subkulturen unter beiden Temperaturbedingungen zunehmend nekrotisch wurde. Daraufhin wurde für alle weiteren Versuche nur noch Kallus verwendet, der auf Medium 3 subkultiviert worden war. Da es aber auf diesem Medium bei weiteren Subkulturen zwar immer zu kräftigem Kalluswachstum, nie jedoch zu einer Differenzierung kam, wurden bei den folgenden Subkulturen weitere Kulturparameter verändert.

a) Temperatur:

Ausgehend von Kallus auf Medium 3 mit 16 Std. täglicher Beleuchtungsdauer und 3000 Lux Lichtintensität bei 18 und 23°C, wurden Teilkulturen zusätzlich auch bei 10 und 27°C, aber sonst unveränderten Bedingungen, angelegt. Somit wuchs jeder Kallus unter vier verschiedenen Temperaturen weiter.

b) Licht:

Von jedem der unter den Bedingungen in a) wachsenden Kalli wurde wiederum ein Teil abgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt. Je eine Schale davon wurde nun bei allen vier Temperaturen und 3000 Lux aber im Dauerlicht weiter kultiviert. Die restlichen acht Schalen wurden, ebenfalls bei allen vier Temperaturen, dunkel gestellt. Davon wurden, im Abstand von fünf Tagen, je zwei genommen, eine wiederum unter Dauerlicht und die andere bei 16 Std. täglicher Beleuchtung weiter gehalten. Außerdem wurden Kulturen bei 1000 Lux getestet.

c) Hormone:

Parallel zu a) und b) wurden Kalli auf Medium gesetzt, das nur 1 mg/l BAP bzw. keine Hormone enthielt. Die resultierenden Kulturen wurden ebenfalls allen unter a) und b) aufgeführten Versuchsbedingungen unterworfen.

Da somit Teile eines jeden Kallus gleichzeitig unter allen in a, b und c aufgeführten Bedingungen gehalten wurden, ermöglichte es dieser Versuch, Aussagen über jeden einzelnen Parameter, aber auch über das Zusammenwirken mehrerer Parameter in allen möglichen Kombinationen zu machen. Nach drei weiteren Subkulturen konnten daher schon einige Versuchsbedingungen als ungeeignet für die Redifferenzierung erkannt werden: zu hohe (27°C) und zu niedrige (10°C) Temperaturen beeinträchtigten das Kalluswachstum und führten schließlich zum Absterben. Den gleichen Effekt hatten Dauerlicht oder Dunkelphasen von mehr als fünf Tagen. Ebenso ungeeignet erwies sich ein teilweiser oder kompletter Entzug von Hormonen, selbst unter sonst guten Kulturbedingungen (18 oder 23°C, bei 16 Std. täglicher Beleuchtung mit 3000 Lux). Auf hormonfreien Medien starb das Kallusgewebe nach zwei bis drei Subkulturen ab. Auf Medien, das nur BAP enthielt, konnte es nur sechs Subkulturen lang erhalten werden. In all diesen Fällen half es nicht, wenn man die Kalli nach ein oder zwei Subkulturen wieder auf Medium 3 mit BAP und NAA setzte, da das Gewebe offensichtlich schon in den ersten Kulturen zu stark geschädigt worden war.

Nachdem weder Temperaturveränderungen noch Änderungen der Lichtverhältnisse in irgend einer Weise stimulierend auf die Kalli gewirkt hatten und teilweiser oder kompletter Hormonentzug ebenfalls nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wurde erneut eine Versuchsreihe konzipiert. Diesmal wurden die Konzentrationsverhältnisse vom BAP zum NAA verändert und einmal BAP durch IPA ersetzt:

Medium	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	IPA (mg/l)
6	3,0	1,0	-
7	1,0	6,0	-
8	-	1,0	3,0

Ausgegangen wurde dabei von Kallus, der auf Medium 3 nunmehr seit zwei Jahren entsprechend 20 Subkulturen, bei 18 und 23°C und 16 Std. täglicher Beleuchtung mit 3000 Lux gehalten worden war.

Nach vier Subkulturen auf diesen Medien, bei denen sich der Kallus überall gleich gut entwickelte, wurde auf das Medium mit IPA verzichtet, da sich keinerlei Vorteil gegenüber dem entsprechenden Medium 6, mit BAP, zeigte. Die Kalli auf allen übrigen Medien wurden routinemäßig alle sechs Wochen auf frisches Medium umgesetzt. Aber bis auf das temporäre Auftreten einzelner Adventivwürzelchen, konnte auch im Verlauf eines weiteren Jahres keinerlei Differenzierung beobachtet werden (Abb. 16-18).

Nach insgesamt 30 Subkulturen bildeten sich jedoch im März 1982 auf dem Kallus der Mutante I xi auf Medium 7 bei 23°C unerwarteterweise kleine helle Sproßknospen. Nach dem Umsetzen des Kallus auf frisches Medium vermehrten sich diese rasch. Dieser Kallus wurde vorsichtig geteilt und Stücke mit Sproßknospen auch auf die übrigen Medien abgesetzt und dort weiter kultiviert. Interessanterweise entwickelten sie sich im Laufe mehrerer Subkulturen am besten auf dem Medium 3,

Mutantenkalli aus den Redifferenzierungsversuchen nach fünfjähriger Kultur auf 2,4-D-freiem Medium

Abb. 16:
Kallus der Mutante I xi

Abb. 17:
Kallus der Mutante II eta

Abb. 18:
Kallus der Mutante I sigma

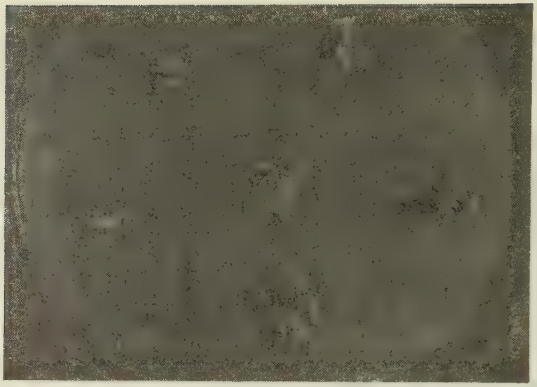

Abb. 19: Spontane Redifferenzierung aus Kallus der Mutante I xi nach dreijährigem, regelmäßigen Subkultivieren auf Medium ohne 2,4-D

Abb. 20: Redifferenzierung aus Kallus der Mutante I xi mit ca. 2 cm langen sproßähnlichen Gebilden

wohingegen sie auf Medium 6 sehr schnell wieder verschwanden. Auf Medium 7 hörte die Entwicklung von Sproßknospen ebenfalls bald wieder auf und es entwickelte sich in weiteren Subkulturen wieder nur grüner Kallus. Auch im Verlaufe eines weiteren Jahres konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen aus dem restlichen Kallus der Mutante I xi oder aus einem der anderen Kalli eine Differenzierung erfolgte. Die oben beschriebenen Sproßknospen vermehrten sich jedoch auf Medium 3 ständig weiter. Dabei kam es immer wieder zur Bildung hellgrüner Sprosse von 2 - 6 mm Länge, vereinzelt aber auch zu blattähnlichen Gebilden, die bis zu 2 cm lang wurden (Abb. 19 + 20). So war es in letztlich vier Jahren gelungen, wenigstens in einem einzigen Falle spontane Redifferenzierung auszulösen.

C. Gewebekultur der Mutanten und der vorhandenen Genom/Plastom-Kombinationen der Euoenotheren

I. Mutanten

Für die Anzucht von Mutantenmaterial stellte Herr Prof. Stubbe reines Saatgut von insgesamt 49 verschiedenen Mutanten zur Verfügung. Davon entfielen 27 auf Mutanten des Plastoms I, 12 auf Plastom II, 4 auf Plastom III, 4 auf Plastom IV und 2 auf Plastom V. Alle diese Mutanten waren aufgrund ihres Farbunterschiedes im Vergleich zum Wildtyp entdeckt worden und in Form einer Panaschierung in einzelnen Blättern oder als ganze Pflanzenteile am Wildtyp aufgetreten. Sie waren, mit dem Wildtypgewebe als Versorgungsquelle, über viele Jahre hinweg erhalten worden.

Die Anzucht reiner Mutanten aus Saatgut auf Erde war nur in einem Fall (II kappa; Kutzelnigg et al., 1975a) möglich. Alle anderen gediehen nicht über das Keimlingsstadium hinaus. Physiologische und ultrastrukturelle Untersuchungen vor allem von Hallier (1968), Hallier et al. (1968), Kutzelnigg et al. (1975a und b) und Hallier und Heber (1977) hatten gezeigt, daß die meisten Mutanten mehr oder weniger Defekte des Photosyntheseapparates aufwiesen, die verhinderten, daß sie ohne

ernährendes Wildtypgewebe existieren konnten (zusammenfassende Darstellung siehe Hallier 1980). Zur Erzeugung reinen Mutantenmaterials war es daher notwendig, dessen Auszucht unter künstlichen Bedingungen in der Gewebekultur zu versuchen. So wurde hier aufbauend auf Voruntersuchungen von Mehra-Palta (zitiert in: Stubbe & Herrmann, 1982) und in meiner Staatsexamensarbeit (Hildebrandt, 1976), im Rahmen dieser Arbeit der Versuch fortgesetzt, die Mutanten als reines Material in der Gewebekultur heranzuziehen. Aus den skizzierten Vorversuchen bot es sich an, Keimblätter und Bereiche am Vegetationskegel neben ganzen Keimlingen als Ausgangsmaterial zu nehmen, sowie das "NT-Medium" versetzt mit 1 mg/l BAP und 3 mg/l NAA zu verwenden. Ziel war es, möglichst einfach und schnell, viel Blattmaterial der Mutanten für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung der jeweiligen Defekte zu erzeugen. Dies gelang am besten mit Vegetationskegelbereichen, die regelmäßig zu vielen Sprossen und kräftigem Blattwachstum führten. Ein gleich gutes Ergebnis erzielte man mit Keimblättern nur, wenn man sie zur Bildung von "Ausgangskalli" zuerst auf Medium 3 plus 0,1 mg/l 2,4-D vorkultivierte. Erst aus dem so erzeugten Kallus entwickelten sich, nach einigen Subkulturen ohne 2,4-D, ebenfalls Sprosse und später größere Mengen an Blattmaterial. Ganze Keimlinge hingegen führten immer nur zu kleinen Einzelpflänzchen. Sie waren deswegen zur Materialbeschaffung weniger geeignet.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit einigen Mutanten, bedingt durch die unterschiedliche Keimfähigkeit des Saatguts oder die Empfindlichkeit der Keimlinge, gelang es, durch entsprechend große Aussaaten oder nach einigen Wiederholungen, alle Mutanten in der Gewebekultur anzuziehen und durch regelmäßiges Umsetzen auf frisches Medium zu erhalten.

Die folgenden Abbildungen 21 - 24 zeigen Beispiele für die Anzucht und Entwicklung des Wildtyps Oenothera hookeri und der Mutanten II jota in der Gewebekultur.

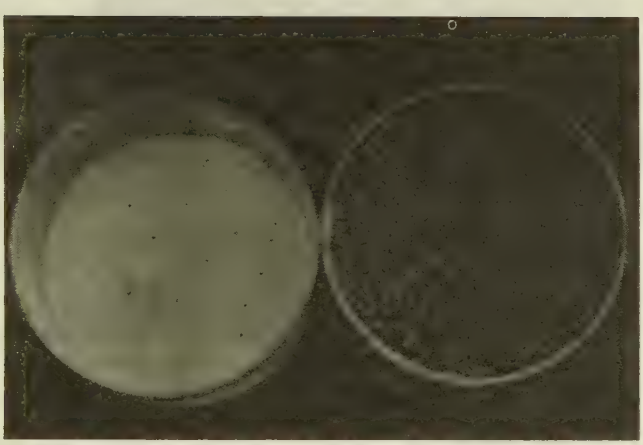

Abb. 21: Keimlinge des Wildtyps Oenothera hookeri (rechts) und der Mutante II jota (links) auf "MS"-Medium

Abb. 22: Weiterentwicklung der Keimlinge aus Abb. 21; ca. 2 Wochen nach dem Umsetzen auf das "NT"-Medium mit BAP:NAA=1:3

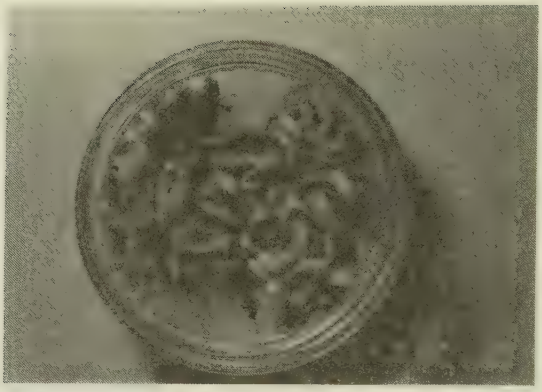

Abb. 23: Die Entwicklung großer Mengen Blattmaterials aus Keimlingen des Wildtyps nach ca. sechswöchiger Kultur auf dem "NT"-Medium mit BAP:NAA=1:3

Abb. 24: Die gleiche Entwicklung aus Keimlingen der Mutante I ypsilon unter den selben Kulturbedingungen

II. Genom/Plastom-Kombinationen

Es gibt innerhalb der Euoenotheren mit ihren drei Grundgenomen A, B und C und den fünf Grundplastomen I - V dreißig Kombinationsmöglichkeiten. Da es aber zwischen den Genomen und Plastomen Wechselwirkungen gibt (Stubbe, 1959), existieren in der Natur nur bestimmte Kombinationen (harmonische Kombinationen, Wildtypen), während andere (disharmonische und extrem disharmonische) nur künstlich erzeugt werden können. Letztere führen zu Farbveränderungen ("Bastardbleichung") der Plastiden und meist auch zu verringerter Vitalität oder sind sogar letal (Stubbe 1959). Eine Anzucht im Gewächshaus oder auf dem Feld ist bei letzteren deshalb in vielen Fällen nicht möglich, weil die Pflanzen schon im Keimlingsstadium absterben (Stubbe 1960, 1963).

Um diese Wechselwirkungen zwischen den Genomen und Plastomen besser studieren zu können, war es auch hier wünschenswert, alle möglichen Kombinationen als Saatgut zu erhalten und in der Gewebekultur heranzuziehen. Dies gelang bisher auch in 25 der 30 möglichen Fälle. Die Kombinationen AB V, BB V, BC II und III sowie CC I waren als Saatgut nicht vorhanden.

Bei der Kultur einiger disharmonischer Kombinationen wie z.B. AA V, CC II und CC III trat jedoch ein Phänomen auf: Die ursprünglich weißen Keimlinge und Pflänzchen ergrünten nach einigen Wochen allmählich auf dem Kulturmedium: Wahrscheinlich handelte es sich dabei um eine schon oft beobachtete Wirkung des Cytokinins, das anscheinend die Chlorophyllbildung anregt bzw. zu dessen Akkumulation beiträgt (Fletcher & McCullagh; 1971, Parthier, 1979).

D. Cytologische Untersuchungen an Gewebekulturmaterial von Mutanten, das auf Medium mit und ohne 2,4-D wächst

Einer der größten Nachteile, Material aus Sterilkulturen für biochemische Zwecke zu nutzen, besteht in der Instabilität der Gewebekulturen. Es sollte daher untersucht werden, ob insbesondere der lange Einfluß von 2,4-D zu Chromosomenanomalien des Materials geführt hatte, wie es von anderen Autoren häufig an Gewebekulturmaterial beobachtet worden ist (Melchers & Labib, 1970; Buiatti et al., 1974; Salmia, 1974; Nuti Ronchi et al., 1976; Ogura, 1982).

a) Kallus der drei Jahre auf 2,4-D enthaltendem Medium gewachsen war

Vor Beginn der unter Abschnitt II. beschriebenen Redifferenzierungsversuche wurde von jedem der verwendeten Mutantenkalli eine Probe abgenommen. Die Ergebnisse der cytologischen Untersuchungen sind in Tabelle XI zusammengefaßt. Aus ihnen wird deutlich, daß 2,4-D, auch nach dreijährigem Einwirken, auf die Ploidiestufe von Gewebekulturmaterial der Oenotheren keinen wesentlichen Einfluß hatte. Bei der in drei Fällen gefundenen Chromosomenzahl von 7 (siehe Tabelle XI) dürfte es sich wohl um Artefakte handeln, d.h. ein Teil der Chromosomen ist bei der Herstellung der Quetschpräparate verloren gegangen.

Eine erneute Untersuchung, nach nunmehr acht Jahren, zeigte jedoch bei einigen Mutanten Unterschiede zu den nach drei Jahren erzielten Ergebnissen (siehe Tabelle XII).

b) Kallus aus den Redifferenzierungsversuchen B II

Vergleichend zu a) wurden Kalli von Mutanten untersucht, die mittlerweile seit fünf Jahren auf Medium 3 wuchsen, also ohne Einfluß von 2,4-D. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in die Tabelle XII aufgenommen.

Tabelle XI: Auswertung der cytologischen Untersuchungen an Kalli, die drei Jahre auf Medium mit 2,4-D gewachsen waren

Material	Anzahl der unabhängigen Präparate	Anzahl der ausgezählten Chromosomensätze	Chromosomensätze mit 2n = 14 Chromosomen		Chromosomensätze mit weniger als 14 Chromosomen		Chromosomensätze mit mehr als 14 Chromosomen	
			absolut	%	absolut	%	absolut	%
I beta	22	70	70	100,0	-	-	-	-
I gamma	33	46	44	95,7	2 (7)*	4,3	-	-
I ny	3	67	66	98,5	1 (7)*	1,5	-	-
I xi	14	45	45	100,0	-	-	-	-
I sigma	4	39	39	100,0	-	-	-	-
II alpha	3	122	121	99,2	1 (7)*	0,8	-	-
II beta	7	66	64	97,0	-	-	2 (56)* (28)*	3,0
II gamma	5	54	54	100,0	-	-	-	-
II eta	3	65	65	100,0	-	-	-	-
III beta	8	76	71	93,4	-	-	5 (2 x 28)* (3 x 30)*	6,6
III gamma	3	88	88	100,0	-	-	-	-
IV beta	4	87	87	100,0	-	-	-	-

*Anzahl der Chromosomen

Ergänzend dazu wurde auch redifferenziertes Gewebe der Mutante I xi cytologisch untersucht. Von den 86 ausgezählten Zellen waren noch 80 (≙ 93%) diploid. Dieser Prozentsatz entsprach etwa dem des undifferenzierten Gewebes (siehe Tabelle XII).

Außerdem wurden zwei Stichproben vom Gewebekulturmaterial der Mutanten untersucht. Das Auszählen der Chromosomensätze in Zellen von Quetschpräparaten einiger Blattspitzen ergab in beiden Fällen zu 100% diploide Chromosomensätze (siehe ebenfalls Tabelle XII). Das Gewebekulturmaterial von Oenothera ist also, unter den hier gewählten Bedingungen, genetisch stabil.

Die Ergebnisse der cytologischen Untersuchungen wurden photographisch dokumentiert. Einige Beispiele daraus zeigen die Abbildungen 25 und 26.

Tabelle XII: Auswertung der cytolog.schen Untersuchungen an Kalli, die acht Jahre auf Medium mit 2,4-D bzw. fünf Jahre auf Medium ohne 2,4-D gewachsen waren

Material		Anzahl der unabhängigen Präparate	Anzahl der ausgezählten Chromosomensätze	Chromosomensätze mit 2n = 14 Chromosomen absolut	%	Chromosomensätze mit 4n = 28 Chromosomen absolut	%	Chromosomensätze mit 56 und mehr Chr. absolut	%
I beta	- 2,4-D	13	61	61	100,0	0	0	0	0
"	+ 2,4-D	3	49	46	93,8	3	6,2	0	0
I gamma	- 2,4-D	20	61	61	100,0	0	0	0	0
"	+ 2,4-D	12	46	41	89,1	5	10,9	0	0
I ny	- 2,4-D	38	202	171	84,7	31	15,3	0	0
"	+ 2,4-D	32	149	117	78,5	30	20,1	2 (56)*	1,7
I xi	- 2,4-D	62	360	321	89,2	35	9,7	4 (56)*	1,1
"	+ 2,4-D	34	92	6	6,5	86	93,5	0	0
I sigma	- 2,4-D	21	37	37	100,0	0	0	0	0
"	+ 2,4-D	24	153	122	79,7	31	20,3	0	0
II alpha	- 2,4-D[1]	-	-	-	-	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	20	120	119	99,2	1	0,8	0	0
II beta	- 2,4-D	7	36	36	100,0	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	47	151	20	13,2	20	13,2	110 (56)* 1(>100)*	73,6
II gamma	- 2,4-D[1]	-	-	-	-	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	16	41	40	97,6	0	0	1 (56)*	2,4
II eta	- 2,4-D	4	151	151	100,0	0	0	0	0
"	+ 2,4-D	23	86	86	100,0	0	0	0	0
III beta	- 2,4-D[1]	-	-	-	-	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	43	85	80	94,1	5	5,9	0	0
III gamma	- 2,4-D[1]	-	-	-	-	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	24	233	19	8,2	14	6,0	200 (56)*	85,8
IV beta	- 2,4-D[1]	-	-	-	-	-	-	-	-
"	+ 2,4-D	16	205	200	97,6	5	2,4	0	0
I xi (rediff.)[2]		12	86	80	93,0	6	7,0	0	0
I ny (GK)[3]		12	39	39	100,0	0	0	0	0
II beta (GK)[3]		4	113	113	100,0	0	0	0	0

*Anzahl der Chromosomen

[1] nicht untersucht

[2] Zellen aus den rediffenzierten Teilen der Mutante I xi

[3] Zellen aus Blattspitzen von Gewebekulturmaterial

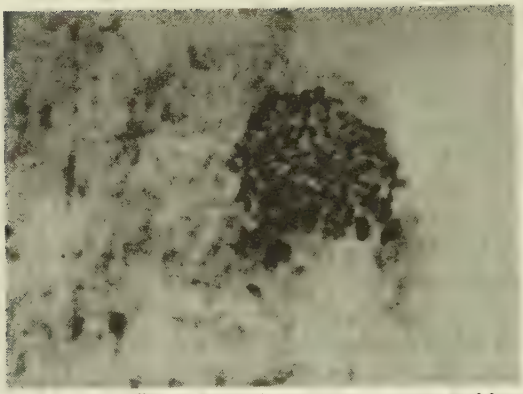

Abb. 25: Zelle mit über 100 Chromosomen aus Kallus der Mutante II beta, der acht Jahre auf Medium mit 2,4-D gewachsen war.

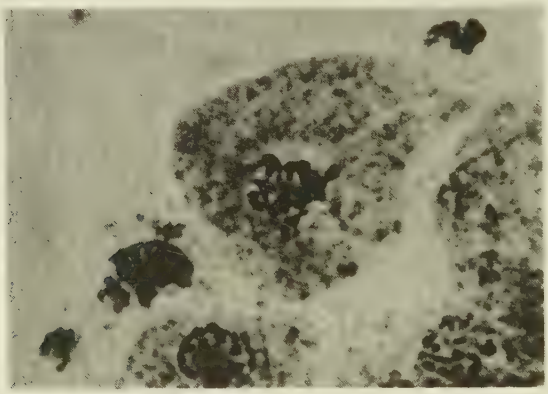

Abb. 26: Zelle mit 14 Chromosomen aus Kallus der Mutante I sigma, der nach dreijährigem 2,4-D-Einfluß, weitere fünf Jahre auf 2,4-D-freiem Medium gewachsen war.

2. Molekularbiologische Untersuchungen an Oenothera

Schon vor Beginn dieser Arbeit waren Versuche unternommen worden, die Plastommutanten von Oenothera genauer zu charakterisieren. Dabei wurden im wesentlichen drei unterschiedliche Experimentalansätze durchgeführt:

1. Man hatte die Struktur mutierter Plastiden elektronenmikroskopisch angesehen und mit denen von Wildtypplastiden verglichen (Kutzelnigg et al., 1974, 1975a und 1975b).

2. Man hatte 28 der 49 existierenden Plastommutanten physiologisch auf ihre Stoffwechseldefekte hin untersucht und dadurch 10 davon eindeutig vier Gruppen zuordnen können: Mutanten mit Defekten im Photosystem I, im Photosystem II, im Cytochrom b6/f-Komplex und in der RuBPcase/oase-Aktivität (Zusammenfassung siehe Hallier, 1980). Die restlichen 21 Mutanten konnten nicht untersucht werden, da zu diesem Zeitpunkt nicht genügend Material zur Verfügung stand.

3. Schließlich waren die RuBPcase/oase-Aktivität eines Wildtyps und von 25 Mutanten gemessen, die löslichen Stromaproteine dieses Wildtyps und von 38 Mutanten gelelektrophoretisch auf ihren Gehalt an RuBPcase/oase hin überprüft und drei der RuBPcase/oase-Mutanten immunologisch untersucht und mit dem Wildtyp verglichen worden (Schmitt, 1978a; Hallier et al., 1978).

Alle diese Versuche wurden dadurch limitiert, daß sie nur an wenig mutiertem Gewebe aus Feld- oder Gewächshausmaterial durchgeführt werden konnten und 21 Mutanten für die physiologischen Untersuchungen überhaupt nicht zur Verfügung standen. Die Messungen der RuBPcase/oase-Aktivität und die gelelektrophoretische Auftrennung der lösliche Plastidenproteine weiterer Mutanten konnten deshalb zum Teil erst dann durchgeführt werden (Schmitt, 1978a), als zusätzlich Gewebekulturmaterial zur Verfügung stand.

Auf der Basis der etablierten Gewebekultur aller Mutanten, der dazugehörigen Wildtypen und auch der meisten der extrem disharmonischen Genom/Plastom-Artbastarde, war es möglich, detailliertere molekularbiologische Untersuchungen am gesamten Oenotheramaterial durchzuführen.

A) "Screening" des gesamten Oenotheramaterials mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese der plastidären Proteine

Zuerst galt es, die Proteine der Wildtypplastiden aufzutrennen und einzelne Proteine oder Proteingruppen durch Vergleiche mit Untersuchungen an anderen Objekten zu identifizieren (Chua & Bennoun, 1975; Chua et al., 1975; Burke et al., 1979; Girard et al., 1980; Hiller et al., 1980; Høyer-Hansen, 1980; Metz & Bishop, 1980).

Darauf aufbauend sollten die Proteinmuster der mutierten Plastiden mit obigen Mustern verglichen werden. Dabei war von folgender Überlegung ausgegangen worden: Die spontan aufgetretenen Mutanten von Oenothera waren ja an ihrem farblichen Unterschied zum umgebenen Wildtypgewebe erkannt worden (Stubbe, 1953; Kutzelnigg, 1968; Kutzelnigg & Stubbe, 1974) und genauere Untersuchungen hatten gezeigt, daß es sich dabei um plastomabhängige Chlorophylldefizienzen handelte, die vom Genom unabhängig waren (Stubbe, 1964, 1966, 1971). Daher sollten sich die Defekte, wie sie aufgrund physiologischer Untersuchungen bei 28 Mutanten festgestellt oder zumindest vermutet wurden, an Veränderungen des Proteinmusters der löslichen bzw. der membrangebunden Proteine der Mutanten, im Vergleich zu denen des zugehörigen Wildtyps, erkennen lassen und dadurch Hinweise auf die Art des Defektes geben können.

Schließlich trat bei extrem disharmonischen Genom/Plastom-Kombinationen "Bastardbleichung" auf, die durch die Genom/Plastom-Unverträglichkeit bedingt war (Stubbe, 1959, 1963). Auch hier sollte man, wenn vielleicht auch nicht auf der Ebene der plastidären Proteine, zumindest bei der Auftrennung der Gesamtproteine, Unterschiede feststellen können.

a) Voraussetzungen für die Proteinanalysen

Durch die Anzucht aller vorhandenen Genom/Plastom-Kombinationen sowie aller Mutanten in Gewebekultur, stand jederzeit genügend Blattmaterial zur Verfügung und es konnten ausgiebige Versuche zur Optimierung der Isolationsbedingungen intakter Wildtyp- und Mutantenplastiden durchgeführt werden. Dabei ergaben sich, je nach Beschaffenheit des Blattgewebes z.B. unterschiedliche Homogenisationszeiten für einen möglichst schonenden Aufschluß des Materials. Weiterhin mußten je nach Material, die Zentrifugationsschritte zum Teil erheblich variiert werden. Gleichzeitig wurden das für die Isolation von Spinatplastiden entwickelte Medium (Jensen & Bassham, 1966; Heber, 1973) den Bedingungen der Oenotheraplastiden angepaßt. Die Trennung der intakten Plastiden von den gebrochenen und den übrigen Zellbestandteilen erfolgte durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation in Silkasol (Morgenthaler et al., 1974; Schmitt & Herrmann, 1977). Um die günstigsten Trennbedingungen zu finden, waren vorher diskontinuierliche Percollgradienten (Bereich 30 - 45% Percoll) unter verschiedenen Zentrifugationsbedingungen getestet werden (Jackson et al., 1979; Takabe et al., 1979).

Alle diese Analysen resultierten in der im Material und Methodenteil beschriebenen Isolationsmethode, die zur Ausbeute von nahezu 90 % der intakten Plastiden führte.

Die Lyse der isolierten Plastiden, ihre Zerlegung in Membran- und Stromaproteine und die Auftrennung der Proteine erfolgten dann nach der von Delepelaire & Chua (1982) beschriebenen Methode; die Proben für die Gelelektrophorese wurden nach Piccioni et al. (1982) vorbereitet und pherographiert.

b) Analyse der Genom/Plastom-Kombinationen

Bei der Auftrennung der Membranproteine tauchten einige interessante Phänomene auf: Je nach Genom oder Plastom wanderten einige Polypeptidbanden, bei sonst identischen Trennmustern, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Genauere Analysen zeigten, daß teils genom- teils plastomabhängige Erbgänge vorlagen, d.h., daß bestimmte Bereiche des Proteinbandenmusters offensichtlich vom Genom, andere wieder vom Plastom bestimmt waren (siehe hierzu Herrmann et al., 1980). Beispielsweise handelte es sich dabei um die α-Untereinheit des ATP-Synthase-Komplexes, das "34 kD"-Protein, das an der Wasserspaltung beteiligt ist, das 44 kD-P-680-Chlorophyll-a-Apoprotein des Photosystems II und die Untereinheit 2 des Photosystems I (Herrmann et al., 1983, 1985; Abb. 27).

c) Charakterisierung der Plastommutanten

1. Die membrangebundenen Proteine

Bei der Auftrennung der Membranproteine fehlten bei fast allen Mutanten Polypeptidbanden oder es waren deutlich schwächere Muster als bei den zugehörigen Wildtypproteinen zu verzeichnen. So fehlten den Mutanten, die einen physiologischen Defekt in einem der Membrankomplexe hatten, Proteine des diesem System zugeordneten Komplexes oder der gesamte Komplex. Weiterhin fehlten bei allen Photosystem-II-Mutanten Proteine, die diesem System zugeordnet werden oder waren

in geringeren Mengen vorhanden als beim Wildtyp. Der Mutante I jota schließlich fehlten Banden, die dem ATP-Synthase-Komplex zugeordnet werden. Die Auftrennung von Membranproteinen aus Plastiden fast aller in der Gewebekultur herangezogenen Mutanten auf 7,5 - 15%-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen zeigen die Abbildungen 28 und 29.

Neben diesen mehr oder minder spezifischen Mutanten, die einen oder mehrere Defekte in einem bestimmten Komplex hatten, traten aber auch pleiotrope Mutanten auf, d.h. solche, die Defekte in mehreren Komplexen aufwiesen. Dabei handelt es sich aber nur in einem Fall um die Folge einer doppelten Mutation (die Mutante II jota war aus der Mutane II zeta hervorgegangen).

Insgesamt konnte so das gesamte Mutantensortiment charakterisiert werden, also auch die Mehrzahl der Stämme, für die physiologische Daten bisher fehlten.

2. Die löslichen Proteine

Die Auftrennung der löslichen Proteine der Mutanten bestätigte eindeutig nur im Falle der Mutante I sigma, daß es sich um eine RuBPcase/oase-Mutante handelte, da in ihrem Muster die prominente Bande der LSU fehlte und die SSU-Bande auch dann nur sehr schwach zu erkennen war, wenn das Gel sehr stark überladen worden war. Alle anderen möglichen RuBPcase/oase-Mutanten, die durch Schmitt (1978a und b) physiologisch charakterisiert worden waren, zeigten das dem jeweiligen Wildtyp entsprechende Muster, d.h. es waren, an den Stellen wo man die LSU- bzw. SSU-Bande erwartet, mehr oder minder prominente Banden vorhanden. Diese Auftrennung der löslichen Proteine aus Plastiden fast aller in der Gewebekultur herangezogenen Mutanten auf 7,5 - 15%-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen zeigen die Abbildungen 30 und 31.

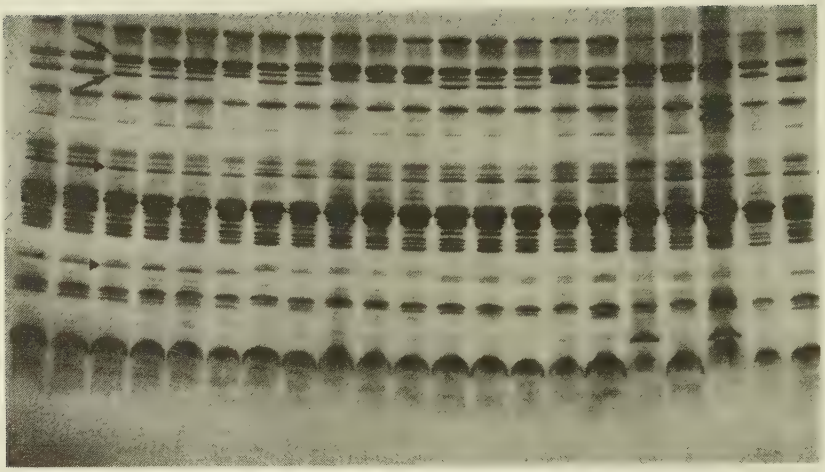

Abb. 27: Auftrennung der plastidären Thylakoidmembranproteine der in der Gewebekultur gezogenen Wildtypen und der Genom/Plastom-Artbastarde von Euoenothera auf einem 7,5-15%-igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen.

Bahn 3: Wildtyp AA-I (Oenothera hookeri); Bahn 4-6: Genom/Plastom-Artbastarde AA-II - AA-IV; Bahn 8: Wildtyp BB-III (Oenothera grandiflora); Bahnen 7+9: Genom/Plastom-Artbastarde BB-II + BB-IV; Bahn 11: Wildtyp CC-V (Oenothera argillicola); Bahn 10: Genom/Plastom-Artbastard CC-IV; Bahn 13: Wildtyp AB-II (Oenothera biennis ssp. caecarium); Bahn 14: Wildtyp AB-III (Oenothera biennis ssp. erythrosepala); Bahn: 12+15: Genom/Plastom-Artbastarde AB-I + AB-IV; Bahn 18: Wildtyp AC-IV (Oenothera parviflora ssp. parviflora); Bahn 16+17: Genom/Plastom-Artbastarde AC-II + AC-III; Bahn 19: Wildtyp BC-IV (Oenothera parviflora ssp. angustissima); Bahn 20: Genom/Plastom-Artbastard BC-V.

Die beiden oberen Pfeile an der Bahn 3 geben die alpha-Untereinheit des ATP-Synthase Komplexes sowie das P680 Chlorophyll a Apoprotein des Photosystem II an, die beide vom Plastom kodiert sind. Die beiden unteren Pfeile bezeichnen die genomkodierten Polypeptide des 34 kD Proteins des Wasserspaltungsapparates und die Untereinheit 2 des Photosystem I Reaktionszentrums.

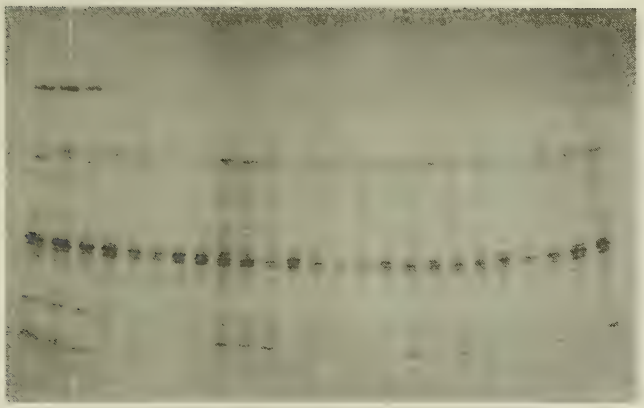

Abb. 28: Thylakoidmembranproteine der Mutanten I alpha - I chi (Bahn 4-25); Bahn 1: Wildtyp AA-I (Oe. hookeri); Bahn 2: AA-IV; Bahn 3: Wildtyp BB-III (Oe. grandiflora).

Abb. 29: Thylakoidmembranproteine der Mutanten I psi - I re (Bahnen 4-7), II alpha - II lambda (Bahnen 8-20), III alpha - III gamma (Bahnen 21-23) und IV beta (Bahn 24+25); (Bahn 1-3, siehe Abb. 28).

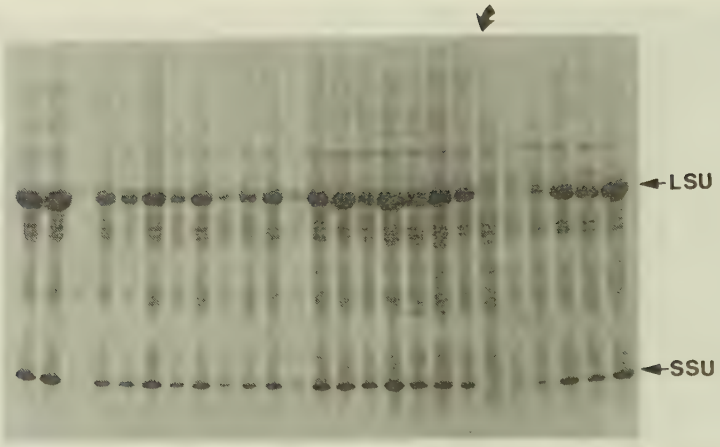

Abb. 30: Stromaproteine der Mutanten I alpha - I psi; die Bahn 20 (Pfeil) zeigt das Polypeptidmuster der Mutante I sigma; (LSU = große Untereinheit, SSU = kleine Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase).

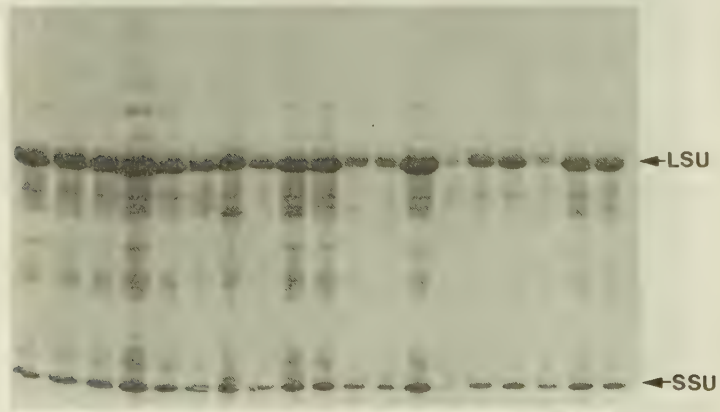

Abb. 31: Stromaproteine der Mutanten I omega - I re (Bahnen 1-4), II alpha - II lambda (Bahnen 5-16) und III alpha - III gamma (Bahnen 17 -19); LSU und SSU, siehe Abb. 30).

B) Detailanalyse der Ribulosebisphosphatcarboxylase/ oxygenase Mutanten

Unter den charakterisierten Mutanten wurden dann die RuBPcase/oase-Mutanten zur genaueren Analyse ausgewählt, mit dem Ziel, die molekularen Defekte zu identifizieren.

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der löslichen Proteine von mutierten Plastiden konnten frühere Ergebnisse von Schmitt (1978a) nur im Falle der Mutanten I sigma bestätigt werden. Allerdings hatte auch schon Schmitt (1978a) darauf hingewiesen, daß die Messungen der RuBPcase/oase-Aktivitäten nicht mit den quantitativen Ergebnissen der gelelektrophoretischen Analysen korrelieren. Es wurde daher eine andere Strategie angewandt, um weitere Aussagen über die Art der Defekte bei dieser Gruppe von Mutanten machen zu können.

1. Immunologische Untersuchungen

Da die gelelektrophoretische Methode oder die Messung der Aktivität von Enzymen nicht besonders empfindlich sind, wurde angestrebt, die Mutanten durch Immunotransfer-Analyse zu charakterisieren (Towbin et al., 1979).

Für diese Analyse wurden von den bisher untersuchten Mutanten alle die gewählt, die nur eine sehr geringe Enzymaktivität hatten und/oder bei denen gelelektrophoretisch die RuBPcase/oase nicht nachzuweisen bzw. gegenüber dem Enzym des Wildtyps verändert war (Schmitt, 1978). Mit Ausnahme der Mutanten II beta, die bei den Voruntersuchungen weder gelelektrophoretisch noch durch eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Enzymaktivität besonders auffiel, wurden acht Mutanten, die Mutanten I zeta, I ny, I sigma, I ypsilon, II epsilon, III alpha, IV beta und V alpha ausgewählt.

Um immunologische Versuche durchführen zu können, bedarf es spezifischer Antikörper. Im Falle der RuBPcase/oase war dies für die LSU kein Problem, da Antikörper gegen die LSU von Spinat und Roggen vorhanden waren, die mit der LSU von Oenothera heterolog reagierten (Hallier et al., 1978). Ebenso reagierte ein Antiserum gegen die LSU von Chlamydomonas eindeutig mit der LSU von Oenothera (Ergebnis hier nicht dargestellt). Jedoch keines, der gegen die SSU vorhandenen Antiseren regierte mit der SSU von Oenothera (Ergebnisse nicht dargestellt; zur Problematik, vergleiche z.B. Brown et al., 1976). Daher war es nötig, spezifische Antikörper gegen die SSU von Oenothera herzustellen.

a) Isolation und Reindarstellung der RuBPcase/oase von Oenothera

Für die Isolation wurde ausschließlich junges Blattmaterial von Oenothera hookeri aus der Gewebekultur verwendet, da der geringere Schleimgehalt dieses Materials, gegenüber den im Feld und Gewächshaus gezogenen Pflanzen, den Zellaufschluß bedeutend erleichterte. Zur Unterstützung der Lyse der Plastiden, wurde das Filtrat des Rohhomogenates bei -80°C schockgefroren und erst nach langsamen Auftauen bei 4°C, scharf abzentrifugiert. Auf diese Weise konnte die Ausbeute an Enzym bedeutend erhöht werden. Die Reinigung der RuBPcase/oase von den übrigen löslichen Proteinen erfolgte dann in zwei Schritten; entweder über Saccharosegradienten oder an DEAE-Austauschersäulen, von denen das Enzym mittels eines NaCl-Gradienten eluiert wurde. In beiden Fällen wurden die Gradienten zwischen den Reinigungsschritten fraktioniert (Abb. 32 und 33) und nur die "peak-Fraktionen" vereinigt, konzentriert, gelelektrophoretisch unter nativen Bedingungen aufgetrennt und die Enzymbande elektroeluiert. Kontrollgele aller Fraktionen nach jeder Fraktionierung verdeutlichen die Effizienz dieser Reinigungsmethoden (Abb. 34 und Abb. 35).

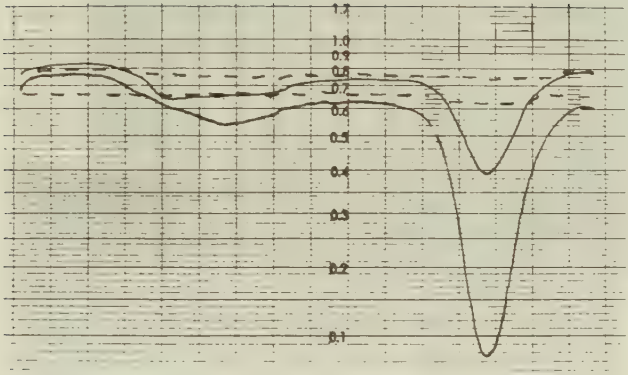

Abb. 32: Schreiberprotokoll der NaCl-Gradientenfraktionierung zur Reinigung der RuBPcase/oase über eine DEAE-Austauschersäule.

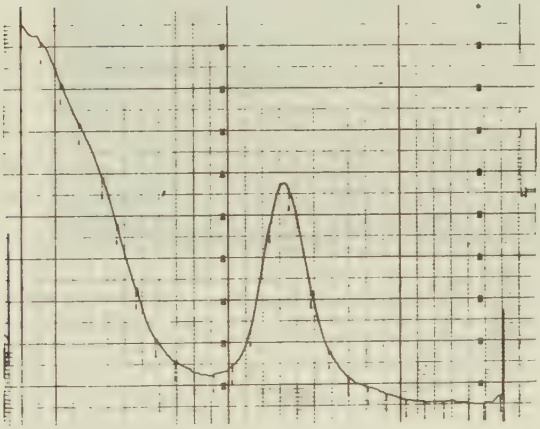

Abb. 33: Schreiberprotokoll der Saccharose-Gradientenfraktionierung zur Reinigung der RuBPcase/oase.

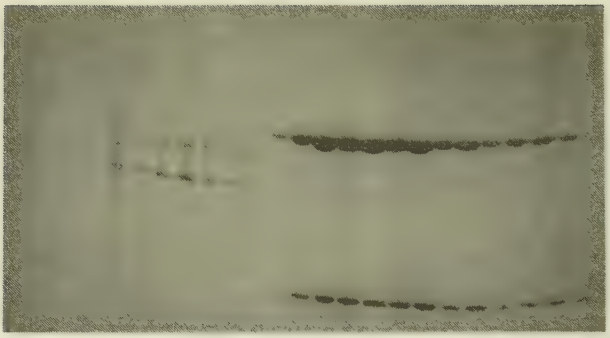

Abb. 34: 7,5-15%-iges Polyacrylamidgel der Fraktionen 1-25 der Saccharosegradientenfraktionierung nach dem ersten Reinigungsschritt der RuBPcase/oase.

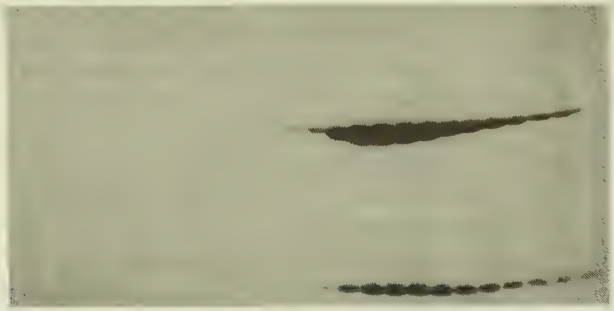

Abb. 35: 7,5-15%-iges Polyacrylamidgel der Fraktionen 1-25 der Saccharosegradientenfraktionierung nach dem zweiten Reinigungsschritt der RuBPcase/oase.

Nach dem zweiten Reinigungs- und Konzentrationsschritt wurde das Enzym auf einem präparativen SDS-Gel in die LSU und die SSU aufgetrennt, die Proteinbanden mit KCl angefärbt (Abb. 36), herausgeschnitten, getrennt elektroeluiert und, bis zur weiteren Verwendung, bei -20°C aufbewahrt (siehe Material und Methoden).

Abb. 36: Demonstrationsgel der präparativen Trennung der LSU von der SSU der RuBPcase/oase aus den "Peakfraktionen" nach dem zweiten Reinigungsschritt (Gel überladen und mit Coomassie Brilliant Blue R angefärbt)

b) Die Erzeugung von Antikörpern gegen die SSU der Oenothera-RuBPcase/oase

Nachdem die ersten Versuche zur Immunisierung von Ratten mit der SSU des Enzyms von Oenothera nicht zur Bildung von Antikörpern geführt hatten, wurden für weitere Immunisierungen Kaninchen gewählt. Außerdem wurden nun die SSU-Partikel durch Phenyldiisocyanat mit Humanalbumin gekoppelt, um so die Antigenizität zu steigern (Laursen et al, 1972). Da auch dieser Versuchsansatz nicht zu dem gewünschten Erfolg führte, wurden schließlich die SSU-Partikel mit Glutaraldehyd untereinander vernetzt und erst dann zur Immunisierung der Kaninchen verwendet (Avrameas, 1969; Reichlin, 1980). Auf diese Weise konnte endlich das Antiserum gegen die SSU in ausreichenden Mengen gewonnen werden.

2. Die Verwendung spezifischer Antikörper gegen die Untereinheiten der RuBPcase/oase von Oenothera

Die "Immunotransfer"-Analysen bestätigten im wesentlichen, die schon aus der gelelektrophoretischen Auftrennung der löslichen Proteine erhaltenen Ergebnisse: Mit Ausnahme der Mutante I sigma, zeigten alle Mutanten, dem Wildtyp vergleichbare Antikörperreaktionen, wenn sie auch bei den Mutanten I ypsilon und IV beta etwas schwächer ausfielen (Abb. 37 und Abb. 38). Bei der Mutante I sigma reagierte das Antiserum gegen die LSU nicht, wie beim Wildtyp, mit einem Polypeptid von ca 55 kD, sondern mit einem von ca 30 kD (Abb. 39). Die SSU konnte aber eindeutig nachgewiesen werden, wenn auch nur in geringerer Menge als beim Wildtyp (Abb. 39). Diese, im Widerspruch zu früheren Ergebnissen stehenden Resultate, machten die erneute Untersuchung dieser Mutanten besonders interessant.

Abb. 37: Autoradiographie der "Immunotransfer"-Analyse mit einem Antiserum gegen die LSU der RuBPcase/oase.

Bahn 1: Wildtyp Plastom I; Bahnen 2-4: Mutanten I zeta, I ny und I ypsilon; Bahn 5: Wildtyp Plastom II; Bahn 6: Mutante II epsilon; Bahn 7: Wildtyp Plastom III; Bahn 8: Mutante III alpha; Bahn 9: Wildtyp Plastom IV; Bahn 10: Mutante IV beta; Bahn 11: Wildtyp Plastom V; Bahn 12: Mutante V alpha.

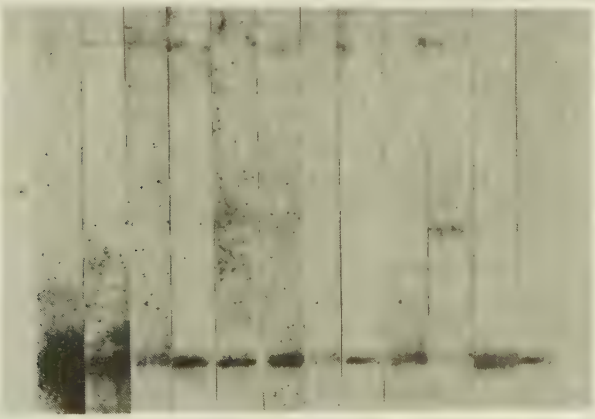

Abb. 38: Autoradiographie der "Immunotransfer"-Analyse mit einem Antiserum gegen die SSU der RuBPcase/oase von Oenothera (Bahnen 1-12 wie in Abbildung 37).

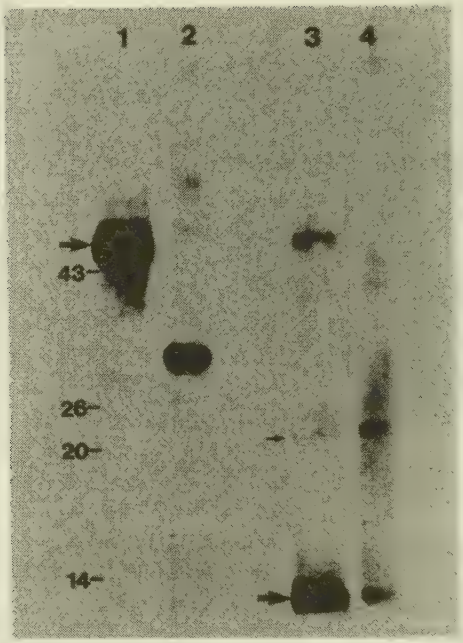

Abb. 39: Autoradiographie der "Immunotransfer"-Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung der löslichen Gesamtproteine aus Blattmaterial des Oenothera-Wildtyps und der Plastommutante I sigma. Nachweis der LSU des Wildtyps und des Partialproduktes der LSU der Mutante I sigma (Bahnen 1 und 2) mit Antiserum gegen die LSU von Spinat, und Nachweis der SSU des Wildtyps und der Mutante I sigma (Bahnen 3 und 4) mit Antiserum gegen die SSU von Oenothera.

C) Die Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase - Mutante I sigma

Schon vor der Entdeckung des verkleinerten LSU-Polypeptids in der Mutante I sigma, waren, aufgrund der Befunde von Hallier et al.(1978), vergleichende Untersuchungen der plastidären DNA dieser Mutante mit der entsprechenden Wildtyp-DNA durchgeführt worden (Gordon et al., 1980). Dabei zeigte ein Vergleich der Fragmentmuster, die man durch Verdauen der DNAs mit Restriktionsendonukleasen erhalten hatte, daß es sich bei einer Mutation der Plastiden-DNA der Mutante I sigma, nicht um eine größere Deletion oder sonstige Veränderung im Strukturgen für die LSU handeln konnte. Die beiden in den Fragmentmustern gefundenen Unterschiede lagen nämlich nicht im kodierenden Bereich des Gens für die LSU, sondern im intercistronischen Bereich der Gene für die 16S und 23S rDNA und in der kleinen "single-copy"-Region des DNA-Moleküls (Gordon et al., 1980). Diese Unterschiede ließen sich aber als Folgen intraspezifischer Variabilität innerhalb des Plastoms I interpretieren und hatten daher offensichtlich nichts mit der vorliegenden Mutation zu tun (Herrmann et al., 1980).

Andererseits konnte aber das Gen für die LSU der Mutanten-DNA durch eine kleinere Deletion oder Punktmutation verändert sein, die im Fragmentmuster nicht zu erkennen wäre. Diese Möglichkeit mußte daher bei einer erneuten Untersuchung berücksichtigt werden.

1. Analyse der Ursache für die Bildung des Partialproduktes der LSU

Um festzustellen, ob die Bildung des verkleinerten LSU-Polypeptids in den Plastiden der Mutante I sigma, Folge einer Mutation im Strukturgen für dieses Polypeptid ist, wurden die Plastiden-DNAs der Mutante und des Wildtyps von Oenothera isoliert und in einem zellfreien, DNA-programmierten gekoppelten Transkription-/Translationssystem aus E. coli transkribiert und translatiert. Dieses System, der Überstand einer

E. coli-Präparation nach Zentrifugation bei 30.000 x g, ist in der Lage, Plastiden-DNA von Spinat und Oenothera gekoppelt zu transkribieren und zu translatieren (Bottomley & Whitfeld, 1979). Da die Plastiden-DNAs gleichzeitig mit (^{35}S)-Methionin inkubiert wurden, konnten die Produkte, nach der gelelektrophoretischen Auftrennung, autoradiographisch nachgewiesen und miteinander verglichen werden. Dieser Vergleich mit den Produkten einer Plastiden-DNA von Spinat zeigte, daß die LSU von Spinat und die des Oenothera-Wildtyps beide ca 55 kD groß sind. Die Identität der Proteine wurde durch partielle proteolytische Verdauung des LSU-Polypeptids sichergestellt.

Die Transkription/Translation der Mutante jedoch resultierte in keinem vergleichbar großen Produkt. Dafür fiel auf der Autoradiographie eine prominente Bande mit einem Molekulargewicht von ca 30 kD auf, die beim Wildtyp nicht vorhanden war (Abb. 40). Daß es sich dabei um ein Partialprodukt der LSU handelte, konnte immunologisch nachgewiesen werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Dies deutete darauf hin, daß sich im LSU-Gen der Mutante tatsächlich eine Mutation befindet, die entweder zu einer vorzeitigen Beendigung der Transkription oder der Translation führt. Die Frage, welche dieser beiden Möglichkeiten vorliegt, ließ sich durch "Northern"-Analyse beantworten. Voraussetzung dafür war allerdings, daß das mutierte Gen in vivo transkribiert wird.

Um dies zu prüfen, wurden die RNAs aus Plastiden vom Wildtyp und der Mutante I sigma isoliert. Anschließend wurden die gereinigten RNA-Fraktionen zellfrei im Kaninchenreticulozytenlysat translatiert und die Produkte immunologisch und gelelektrophoretisch analysiert. Abbildung 41 zeigt, daß von der Wildtyp-RNA die komplette LSU, von der Mutanten-RNA aber wieder nur ein ca 30 kD großes Teilprodukt der LSU dechiffriert wird. Offenbar wird also auch in der I sigma die entsprechende mRNA in vivo produziert.

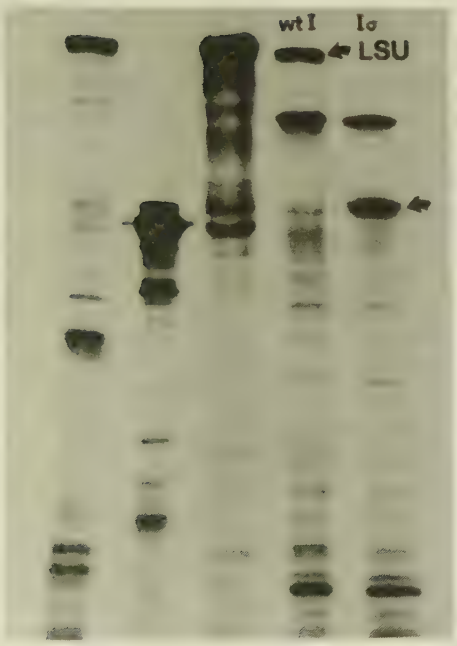

Abb. 40:
Gekoppelte Transkription-Translation von Gesamt-Plastiden-DNA von Oenothera hookeri und der Mutante I sigma (Bahnen 4 + 5) und die Kontrollen: Spinatplastiden-DNA (Bahn 1), pBR 322 (Bahn 2) und das Plasmid pSoc 149; weitere Erläuterungen im Text.

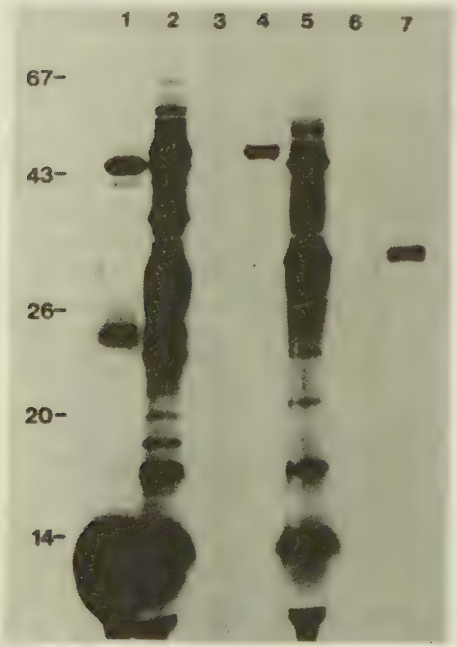

Abb. 41:
Fluorographie einer Plastiden-RNA-Translation im zellfreien Kaninchenreticulozytenlysat mit anschliessender Immunopräzipitation mit Antiserum gegen die LSU von Spinat. Bahn 1: Kontrolle ohne RNA; Bahnen 2 und 5: Translationsprodukte der Wildtyp- bzw. Mutanten-RNA; Bahnen 3 und 6: Präimmunserum; Bahnen 4 und 7: Immunopräzipitation mit Anti-LSU: Wildtyp (Bahn 4), Mutante (Bahn 7).

Damit nun die Frage, ob ein transkriptionelles oder ein translationelles Stopsignal vorliegt, geklärt werden konnte, wurden die Gesamt-RNAs aus Plastiden des Wildtyps und der Mutante isoliert, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulosepapier transferiert. Anschließend wurden sie, zusammen mit RNA aus Spinatplastiden als Kontrolle, an ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment hybridisiert, das durch "nick-translation" des PstI/EcoRI-Inserts aus dem Plasmid pSoc 149 hergestellt worden war. Das Insert enthält ca 90 % der Kodierungsregion des LSU-Gens von Spinat (Zurawski et al., 1981), es ist 1,3 Kilobasenpaare groß und enthält das gesamte Strukturgen der LSU bis auf 25 Basenpaare am 3'-Ende und 350 Basenpaare am 5'-Ende.

Wie auf der Abbildung 42 zu erkennen ist, hybridisiert diese Sonde sowohl mit der Wildtyp- als auch mit der Mutanten-mRNA an der gleichen Stelle. Dies bedeutet, daß beide mRNAs gleich groß sind, das LSU-Teilprodukt der Mutante also Folge einer frühzeitigen Beendigung der Translation der mRNA ist. Es muß daher im LSU-Gen der Mutante I sigma ein translationelles Stopsignal geben.

2. Analyse der SSU in der Mutante I sigma

Aus den Ergebnissen von Immunodiffusionstests mit löslichen Proteinen aus Plastiden der Mutante und Antiserum gegen die RuBPcase/oase von Roggen und Spinat, bei denen die SSU nicht nachgewiesen werden konnte, schlossen Hallier et al. (1978), daß, in Ermangelung der ebenfalls nicht nachweisbaren LSU, die SSU überhaupt nicht synthetisiert oder sehr schnell wieder abgebaut wurde. Meine immunologische Untersuchungen wiesen jedoch nach, daß sowohl ein Partialprodukt der LSU als auch geringe Mengen der SSU in den Plastiden der Mutante enthalten sind (siehe Abb. 39). Die SSU wird also auch in der Mutante synthetisiert. Zu klären blieb die Ursache für die geringen Mengen an SSU in den Plastiden der Mutante I sigma: Sind

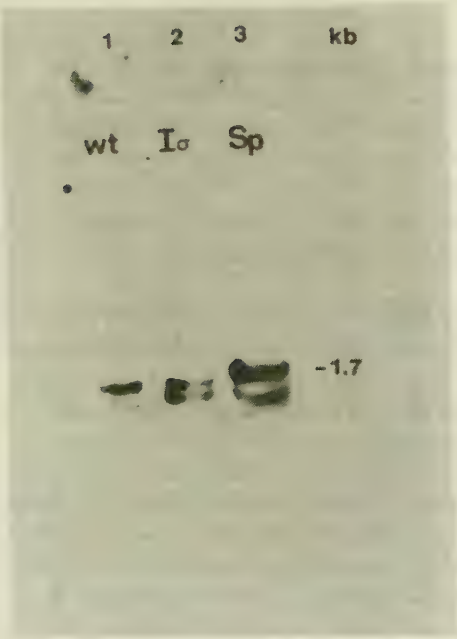

Abb. 42:
Nachweis der mRNAs in den Plastiden des Wildtyps und der Mutante I sigma durch "Northernblot"-Analyse mit "nick"-translatierter DNA. Bahn 1: mRNA des Wildtyps; Bahn 2: mRNA der Mutante I sigma: Bahn 3: Spinat-mRNA (Kontrolle); weitere Erläuterungen im Text

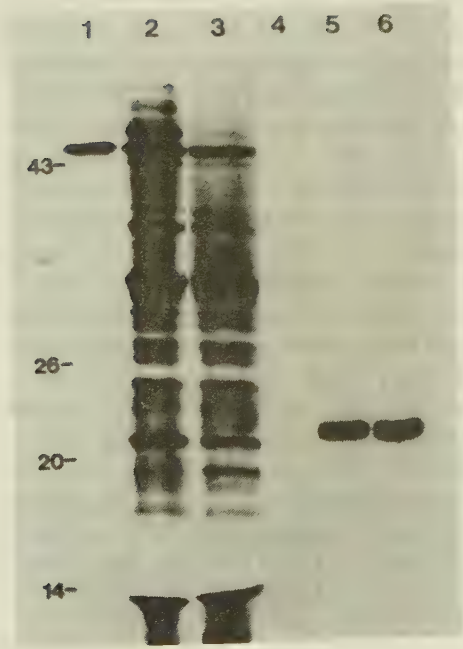

Abb. 43:
Fluorographie der cytosolischen Poly A^+-RNA-Translation im zellfreien Kaninchenreticulozytenlysat mit anschließender Immunopräzipitation mit Anti-SSU gegen Oenothera. Bahn 1: Kontrolle ohne RNA; Bahnen 2 und 3: Translationsprodukte der Gesamt-RNAs vom Wildtyp (2) und der Mutante (3); Bahn 4: Präimmunserum; Bahnen 5 und 6: Immunopräzipitation (Wildtyp, 5; Mutante, 6); weitere Erläuterungen im Text.

sie eine Folge der geringeren Produktion der Vorstufe im Cytosol oder wird die SSU in den Plastiden sehr schnell wieder abgebaut, weil sie nicht in der Lage ist, mit dem LSU-Partner das Holoenzym zu bilden?

Um diese Frage beantworten zu können, mußten die mRNAs für die SSU des Wildtyps und der Mutante analysiert werden.

Deshalb wurden die Poly(A)$^+$-RNAs von beiden isoliert (siehe Material und Methoden), im zellfreien Kaninchenreticulozytenlysat translatiert und die Produkte mit Antiserum gegen die SSU von Oenothera immunopräzipitiert. Die Ergebnisse der Fluorographie der (^{35}S)-Methionin markierten Translations- und Immunopräzipitationsprodukte sind in Abbildung 43 dargestellt. Daraus geht eindeutig hervor, daß die mRNAs des Wildtyps und der Mutante in SSU-Vorstufen übersetzt werden, die das gleiche Molekulargewicht haben. Die vergleichbare Translationsintensität des Wildtyps und der Mutante zeigt an, daß die mRNAs in vergleichbaren Mengen produziert werden.

Um die Translationsprodukte der mRNAs auch in vivo beurteilen zu können, wurden die löslichen Gesamtproteine aus Blättern des Wildtyps und der Mutante I sigma isoliert und auf einem 7,5-15%igen Polyacrylamid-Gradientengel mit SDS unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurden sie auf Nitrozellulosepapier transferiert und mit Antiserum gegen die SSU von Oenothera inkubiert. Die Autoradiographie ergab die gleichen Ergebnisse wie die "Immunotransfer"-Analyse der löslichen Plastidenproteine: In beiden Fällen war SSU vorhanden, bei der Mutante jedoch in geringerer Menge. Zusätzlich zeigte sich aber auch eine Reaktion mit der Vorstufe der SSU (Abb. 39). Die Bildung gleich großer Vorstufen der SSU in gleichen Mengen bei der in vitro Translation der mRNAs und der Vergleich mit den in vivo vorhandenen Mengen der Endprodukte deuten darauf hin, daß die Ursachen für die geringen Mengen an SSU in der Mutante I sigma, wahrscheinlich deren schnellerer Abbau in den Plastiden ist.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem genetisch jahrzehntelang studierten Material (Oenothera) versucht, molekularbiologisch orientierte Arbeiten bis hin zur Gewebekultur, in weiterem Sinn also entwicklungsphysiologische Ansätze, modellhaft zu kombinieren. Die Experimentalansätze sind letztlich für eine umfassende Bearbeitung und damit zum Verständnis vielzelliger höherer Pflanzen mit ihrem kompartimentierten genetischen Apparat erforderlich.

A. Gewebekultur an Oenothera

Die erfolgreiche Anzucht pflanzlichen Gewebes durch aseptische Kultur hängt von verschiedenen Parametern ab; physiologische, chemische und physikalische Faktoren spielen entscheidende Rollen (siehe Street, 1977, Vasil, 1980, u. v.a.). Hier galt es zunächst, optimale Kulturbedingungen für die Wildarten und, darauf aufbauend, für die teilweise subletalen, extrem disharmonischen Genom/Plastom-Artbastarde und die allein nicht lebensfähigen Mutanten der Euoenotheren zu finden. Hauptziele dabei waren, die generelle Reaktion der Oenotheren unter verschiedenen Kulturbedingungen einschätzen zu lernen und darüberhinaus möglichst viel genetisch einheitliches Blattgewebe zu erzeugen, um biochemische und molekularbiologische Untersuchungen insbesondere des Mutantenmaterials durchführen zu können. Es ist wegen der diffizilen Einzelpflanzenanzucht nicht möglich, mit vertretbarem Aufwand, physiologisch einheitliches Material in ausreichender Menge auf dem herkömmlichen Wege über panaschierte Pflanzen zu erhalten.

Die Fähigkeit zur Redifferenzierung von Wurzeln, Sprossen oder ganzen Pflanzen aus den verschiedenen Oenothera-Explantaten zeigt, wie bei anderen Pflanzen, erhebliche Unterschiede, auch wenn das Ausgangsmaterial sich in einem vergleichbaren physiologischen Zustand befindet. In Vorversuchen stellten sich vor allem die Teile von ca. 10

Tage alten Keimlingen und das "NT-Medium" (Nagata & Takebe, 1971) als besonders geeignet heraus (Hildebrandt, 1976), die daher in dieser Arbeit verwendet wurden.

Für eine erfolgreiche Gewebekultur sind desweiteren Faktoren, wie der pH-Wert des Mediums, sein Zustand (fest oder flüssig), die Luftfeuchtigkeit in den Kulturräumen, die Temperatur und das Licht (Dauer, Wellenlängenbereich, Intensität) von entscheidender Bedeutung. So liegt der günstigste pH-Bereich für die Kultur von Oenothera, wie bei vielen anderen Pflanzen, zwischen 5,5 und 5,8. In diesem pH-Bereich gibt es auch keine Schwierigkeiten mit der Gelierung des Agars; bei Werten unter pH 5,0 wird der Agar häufig nicht fest (Hydrolyse). Bei zu weichem Substrat sinken die Gewebeteile unter die Agaroberfläche, wodurch das Material leidet, da der Gasaustausch mit der Umgebung verhindert wird. Bei zu festem Agar wird das Pflanzenmaterial beim Absetzen beschädigt und außerdem ist offenbar die Diffusion der Nährstoffe zur Pflanze und der von der Pflanze ausgeschiedenen Substanzen (etwa schädliche Polyphenole) behindert. Ohne Zweifel spielt neben der Konsistenz, auch die richtige Wahl der Agarsorte für den Erfolg einer Gewebekultur eine wichtige Rolle. Hier wurde, nach ausführlichen Vergleichsversuchen, ausschließlich Difco Bacto Agar verwendet. Die Luftfeuchtigkeit in den Kulturräumen sollte bei 80% liegen, damit die Kulturen nicht zu schnell austrocknen. Ein weiterer bedeutender Faktor ist die Temperatur. Für die Anzucht der Oenotheren lag das Temperaturoptimum bei 23 $\pm$ 1 °C. Bei niedrigeren Temperaturen verlief das Wachstum erwartungsgemäß verlangsamt. Bei Temperaturen über 27 °C wurde das Kulturgut schon nachhaltig geschädigt; Temperaturen über 30 °C führten zum Absterben des Gewebematerials, wohl weil hier die Atmungsquotienten zu ungünstig liegen. Dieser verhältnismäßig enge Temperaturbereich, in dem sich das Gewebe am besten entwickelt, zeigt, wie relativ anfällig in vitro-Kulturen im Gegensatz zu Freilandpflanzen besonders auf Temperaturerhöhungen reagieren. Ähnliches gilt für die Beleuchtung. Eine Lichtintensität von 3000 Lux war für die Entwicklung der

meisten Oenothera-Kulturen optimal. Nur einige sehr helle Mutanten und Genom/Plastom-Artbastarde wuchsen bei ca. 1500 Lux besser, während sich die normal grünen Wildtypen und die übrigen Mutanten bei dieser Lichtintensität langsamer entwickelten, Lichtintensitäten von mehr als 3000 Lux schädigten jedoch das Kulturgut genau wie zu hohe Temperaturen. Die spektrale Zusammensetzung des verwendeten Lichtes übt ebenfalls einen Einfluß auf das Wachstum und die Art der gebildeten Organe bei Differenzierungsversuchen aus (Thorpe, 1980). Für die vorliegenden Arbeiten wurden generell nur Tageslichtröhren für die Beleuchtung verwendet, deren Spektralbereich von 370 bis 750 nm reicht und deren Maxima zwischen 450 und 500 nm bzw. 550 und 650 nm liegen.

Seit den Untersuchungen von Skoog und Miller (1957) ist bekannt, daß das qualitative Verhalten von Kulturen vor allem von der Balance extern zugeführter Hormone abhängt. Die Wirkung der Hormone ist abhängig von deren Präsenz in bestimmter Konzentration, die sich aus dem endogen im Gewebe vorhandenen Hormonspiegel, den exogen zugefügten Hormonmengen und den Möglichkeiten zur Aufnahme, zum Transport und zur Verwertbarkeit dieser Hormone zusammensetzt. Die molekularen Mechanismen, die den Hormonwirkungen zugrunde liegen, sind ungeklärt (Narayanaswami, 1977; Jacobsen, 1983). Bekannt sind jedoch die Größenordnungen endogener Hormonspiegel und daß die Cytokinin/Auxin-Verhältnisse in den verschiedenen Teilen einer Pflanze unterschiedlich sind (Letham et al., 1978; Moore, 1979). Man kann allein schon von daher eine unterschiedliche Reaktion der einzelnen Gewebe auf exogen zugeführte Hormone erwarten.

Vor allem die Cytokinin- und Auxin-Konzentrationen bestimmen die Art der Organogenese. Die verschiedenen verfügbaren natürlichen und künstlichen Auxine und Cytokinine besitzen allgemein, je nach Pflanzen- und Gewebeart, unterschiedliche Wirkungsgrade. Dies macht es erforderlich, auch für die Oenotheren, die geeignetsten Hormonkombinationen zu finden. Es war dabei in einigen Fällen möglich, künstliche Hormone zu verwenden, die oft erheblich stabiler als natür-

liche sind. Die synthetischen Auxine NAA und 2,4-D sind z.B. weitaus stabiler als die natürlich in den Geweben enthaltene Indolylessigsäure (Jacobsen, 1983). Da bei Oenothera 2,4-D, wie bei vielen zweikeimblättrigen Pflanzen, zwar die Zellteilung fördert, die Organogenese jedoch völlig unterdrückt, wurde bei meinen Kulturversuchen NAA als exogene Auxinquelle verwendet. Von den Cytokininen stellte sich BAP als das geeignetste heraus. Die Sproßbildungspotenz von IPA ist schwächer als die von BAP, die Reaktion des Gewebes auf trans-Zeatin fiel allgemein noch schwächer aus und "mixed"-Zeatin war für die Induktion der Organogenese bei Oenothera gänzlich ungeeignet. Es ist nicht bekannt, ob diese Unterschiede der Cytokininaktivitäten, die alle Adeninderivate sind, die sich nur in ihren Substituenten am N^6 unterscheiden, an der metabolischen Stabilität der Komponenten in der Zelle liegen oder tatsächlich Unterschiede der Hormone darstellen. Phenolische Substanzen, Gibberelline, Ethylen, Abscissinsäure und ähnliche Zellinhaltsstoffe, die ebenfalls Differenzierungen, sowohl in vivo als auch in vitro, beeinflussen (Letham et al., 1978; Moore, 1979), wurden hier nicht weiter untersucht.

Von den Cytokininen erwies sich also BAP, in Verbindung mit dem Auxin NAA, für die Sproß- bzw Pflanzenbildung, als am besten geeignet. Daß Auxin tatsächlich primär für die Wurzelbildung verantwortlich ist, wird allein schon an der Beobachtung klar, daß Wurzeln meist auf Medien mit den höchsten NAA-Konzentrationen gebildet wurden und zwar unabhängig vom verwendeten Cytokinin. Einzig BAP komplementierte die NAA-Wirkung in diesen Medien so, daß gleichzeitig viele Sprosse und ganze Pflänzchen gebildet wurden.

Die einzelnen Explantatarten der Oenotherakeimlinge reagierten recht unterschiedlich auf Hormoneinflüsse. Die differenzierteste Reaktion zeigten die Keimblätter, die sowohl auf die verschiedenen Cytokinine als auch auf die unterschiedlichen Auxin/Cytokinin-Verhältnisse qualitativ und quantitativ jeweils spezifisch reagierten. Entsprechend bildeten sich aus diesem Explantat Sprosse, Wurzeln, Kallus

oder auch ganze Pflänzchen. Eine generell schwächere morphogenetische Reaktion zeigten Hypokotyle, aus denen sich z.B. nur noch vereinzelt Sprosse oder ganze Pflänzchen regenerieren ließen. Bei den Wurzeln kam es, unter allen gewählten hormonellen Bedingungen, höchstens noch zur Differenzierung weiterer Wurzeln oder zur Verlängerung der Explantate. Die Vegetationskegelbereiche wurden, sieht man von der 2,4-D-Wirkung ab, erwartungsgemäß immer zu Pflänzchen ergänzt. Lediglich graduelle Unterschiede wurden bei unterschiedlichen Hormonverhältnissen festgestellt. Die Befunde aus voll entwickeltem Blattgewebe sind ähnlich wie die der Keimblätter.

Es ist auch für Oenothera nicht klar, ob für die unterschiedlichen Reaktionen der Explantate, Keimblätter, Bereiche um den Vegetationskegel, Hypokotyle und Wurzeln, auf die Hormongaben, allein die Summe der Hormone (endogen + exogen) oder Aufnahme, Transport und Metabolismus der exogen zugefügten Hormone eine Rolle spielen oder/und ob dies an der Kompetenz der Gewebe liegt. Verminderte Redifferenzierungsfähigkeit wird allgemein beobachtet. Als Ausnahmen werden in der Literatur nur Atropa und Daucus genannt, bei denen es gelang, auch aus Wurzeln Sprosse zu regenerieren (Thomas & Street, 1972).

Der Differenzierung geht grundsätzlich die Bildung von Kallus am Explatat voran. Diese Kallusbildung ist eine Wundreaktion, von der Haberlandt (1902) annahm, daß sie durch zwei Hormone gesteuert wird: ein "Wundhormon", das die Kallusbildung initiiert, und ein "Leptohormon", das bei Wundverschluß für die Beendigung des Kalluswachstums sorgt. Steward und Caplin griffen diese Idee 1951 wieder auf, behaupteten aber, daß das "Wundhormon" nur für die Induktion der ersten Teilungen, nicht aber für die Kallusbildung selbst verantwortlich sei. Yeoman (1980) schließlich subsummiert alle bekannten Ergebnisse dahingehend, daß das anfängliche Kalluswachstum primär eine Wundreaktion sei, die aber nicht durch ein "Leptohormon" beendet werde. Offenbar

infiltrieren polyphenolische Substanzen das Kallusgewebe, sorgen für Wundverschluß und beenden das Kalluswachstum. Auch die an den Schnittstellen der Oenotherakeimlinge auftretenden Wundreaktionen führten zur Kallusbildung. Die exogen zugeführten Hormone verhindern offenbar jedoch, daß diese Kallusbildung aufhörte.

Zur Erzeugung eines raschen und kontinuierlichen Kalluswachstums eignet sich bei dikotylen Pflanzen das synthetische Auxin 2,4-D besonders gut; seine Wirkung kann in vielen Fällen durch die gleichzeitige Zugabe eines Cytokinins noch verbessert werden. 2,4-D unterdrückt die morphologische Potenz eines Gewebes total, selbst am Vegetationskegel. Explantierte Vegetationskegel werden nach kurzer Zeit völlig überwuchert. Die Struktur eines so erzeugten Kallus ist jedoch mit der von Wundkallus nicht mehr vergleichbar. Abgesehen davon, daß er sich in Farbe (hell vs. grün) und Stoffwechsel grundsätzlich von diesem unterscheidet, wächst der erstgenannte locker und zerfällt leicht in Einzelzellen, der letztgenannte wächst dagegen kompakt (siehe dazu Street, 1977). 2,4-D-Zusätze können also unter Umständen bei Suspensionskulturen pflanzlicher Zellen eingesetzt werden, um Aggregatbildung zu unterbinden.

Aber so wertvoll 2,4-D für die rasche Bildung großer Mengen an Kallus ist, so nachteilig wirkt sich sein Einfluß meist auf die Chromosomenzahl aus. Auch beobachtet man generell den Verlust zur Fähigkeit der Redifferenzierung. Der letztgenannte Einfluß ließ sich bei Oenothera zwar in einem begrenzten Zeitraum wieder aufheben, Differenzierung war aber nach mehr als drei Monaten, von einer Ausnahme abgesehen, nicht mehr erzielbar. Bei diesen Redifferenzierungsversuchen zeigte sich allerdings nach noch längerer 2,4-D-Einwirkung häufig, ein schon von Wilson und Street (1975) an Kallus von Hevea brasiliensis beobachtetes Phänomen: Schon auf dem ersten Subkulturmedium ohne 2,4-D bildeten sich kleinere Würzelchen. Diese entwickelten sich aber nicht weiter, sondern verschwanden wieder und auch nach mehrjährigem ständigen Subkultivieren kam es zu keiner erneuten Wurzel-

oder sonstigen Differenzierung. Die plötzliche morphogenetische Aktivität des Kallus der Mutante I xi, der nach dreijährigen vergeblichen Redifferenzierungsversuchen, spontan sproßähnliche Bereiche abgliederte, die sich bis heute erhalten und vermehren lassen, ist unerklärlich.

Der zweite Effekt von 2,4-D, die Chromosomeninstabilität, die ebenfalls von vielen Autoren beobachtet und beschrieben wurde, ist bei Oenothera relativ wenig ausgeprägt. Ausser mit Hilfe von 2,4-D frisch erzeugtem Kallus, standen für die cytologischen Untersuchungen noch Kalluskulturen zur Verfügung, die bereits 1975 von Frau Dr. Mehra-Palta angelegt worden waren. Genetische Veränderungen (Polyploidisierung, Aneuploidisierung) in Gewebekulturen unter dem Einfluß von 2,4-D sind seit den sechziger Jahren von Tulekke (1961), Partanen (1963), Murashige und Nakano (1965, 1967), Heinz und Mee (1971), Bennici et al. (1971), Bennici (1974), Buiatti et al. (1974), Salmia (1974), Bayliss (1973, 1975), Nuti-Ronchi (1976), Sunderland (1977), D´Amato (1975, 1977, 1978), Constantin (1981) und Ogura (1982) beschrieben worden. Dagegen wird nur in einem Fall von stabilen Chromosomenzahlen unter 2,4-D-Einfluß bei Crepis capillaris berichtet (Reinert & Küster, 1966). Über den Mechanismus, der zu chromosomalen Veränderungen führt, gehen die Meinungen der Autoren weit auseinander. So behaupten Bennici et al. (1971), daß der allgemeine Hormonspiegel und andere Faktoren bei der Gewebekultur für den Ploidiegrad des kultivierten Gewebes verantwortlich ist und nicht etwa das 2,4-D alleine. Diese Meinung wird von Bayliss (1973) unterstützt, der dem 2,4-D ebenfalls höchstens eine unterstützende Wirkung zumißt und es sonst nur als Auslöser von desorganisiertem Wachstum sieht. Der selbe Autor geht 1975 sogar noch weiter, indem er behauptet, die Veränderungen des Ploidiegrades des Gewebes im Laufe einer längeren Kultur, seien die Folge einer Selektion auf besser wachsende Gewebe, da oftmals Gewebe höherer Ploidiestufen besser wächst. Andere Autoren bezeichnen 2,4-D als schwaches Spindelfasergift, das den Ablauf der Mitose stört. Diese Wirkung des 2,4-D nachgewiesen zu haben, behaupten Prassad und Das (1977).

Allerdings läßt sich ein solcher Effekt auch bei Verwendung von NAA erzielen, so daß es sich wohl eher um einen allgemeinen Auxineffekt handelt. Die in der Literatur vorhandenen Angaben über Chromosomenverhältnisse in Kalluskulturen sind jedoch meist unvollständig oder ungenau (siehe dazu Bayliss, 1980); so fehlen z. B. meist Angaben über das Alter der untersuchten Kalli und die Anzahl der vorhergegangenen Subkulturen; es fehlen Angaben über die Anzahl und die Art, wie von jedem Kallus Proben entnommen worden sind oder über die Zahl der insgesamt ausgezählten Zellen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen berücksichtigen weitgehend alle von Bayliss (1980) als wichtig erachteten Parameter. So wurde für alle Untersuchungen Kallus fixiert, der sich an altem Kallus zehn Tage nach einer Subkultur neu gebildet hatte. Die erste Untersuchung wurde nach insgesamt 30 und eine weitere nach 50 sechswöchentlichen Subkulturen auf Medium mit 2,4-D durchgeführt. Parallel zu der ersten Untersuchung wurden von den selben Kalli Teile entnommen, auf 2,4-D-freies Medium mit verschiedenen NAA- und BAP-Konzentrationen abgesetzt und ebenfalls nach 50 Subkulturen erneut analysiert. So konnte einmal ein möglicher 2,4-D-Einfluß auf Oenothera-Kalluskulturen nach drei- und achtjährigem Einwirken des 2,4-D untersucht und verglichen werden. Außerdem stand Kallusgewebe zur Verfügung, das fünf Jahre ohne 2,4-D weitergewachsen, also "habituiert", war (Gautheret, 1955; Buiatti & Bennici, 1970; Lutz, 1971) und zusätzlich noch die Teile des Kallus der Mutante I xi, der zumindest eine Art Morphogenese zeigte. Von all diesen Kalli wurden jeweils bis zu 62 Proben entnommen und bis zu 360 Zellen mit Metaphasechromosomen ausgewertet.

Die ersten Untersuchungen nach drei Jahren 2,4-D-Einfluß belegen die relative Stabilität der Oenothera-Kulturen. Nur zwei Kalluskulturen wiesen in wenigen Zellen eine Abweichung von der normalen diploiden Chromosomenzahl auf. Im ersten Fall waren es zwei von 66 ausgezählten Zellen

(≙ 3%), die tetra- bzw. oktoploid waren; im zweiten Fall waren 5 von 76 (≙ 6,6%) tetra- oder aneuploid. Diese Abweichungen sind so gering, daß ein 2,4-D-Effekt für diese Abweichungen wenig wahrscheinlich erscheint. Vielmehr dürfte es sich hier um spontane Veränderungen in einzelnen Zellen handeln, wie sie auch sonst in pflanzlichem Gewebe hin und wieder auftauchen.

Bei der zweiten Untersuchung, nach insgesamt acht Jahren 2,4-D-Wirkung, waren zwar mehr Aberrationen zu beobachten, aber das Ausmaß ist immer noch geringer als bei anderen Pflanzen und es ist nicht klar, ob die beobachteten Aberrationen auf dem Einfluß von 2,4-D beruhen. Während der Kallus, der nunmehr seit fünf Jahren auf Medien ohne 2,4-D wuchs, bis auf zwei Ausnahmen mit nur noch 84,7 bzw. 89,2% diploiden Chromosomensätzen, weiterhin zu fast 100% diploid blieb, waren die Kalli nach achtjährigem 2,4-D-Einfluß, bis auf eine Ausnahme mit 100% diploiden Chromosomensätzen, etwas weniger stabil geblieben. Jetzt lag der Prozentsatz der Zellen mit abweichenden Chromosomenzahlen zwischen 6 und 20% und in drei Fällen sogar bei 91,8 (III gamma), 93,5 (I xi) und 86,8% (II beta). In diesen drei Fällen mögen jedoch ungünstige Kulturbedingungen (Absetzen überalteter Kulturen) für die Veränderung der Ploidiestufe verantwortlich sein. Diese Frage sollte nochmals gezielt studiert werden. Sieht man von diesen drei Abweichungen ab, so zeigen fast alle Kalluskulturen, ob mit oder ohne 2,4-D-Einfluß, auch nach sehr langen Kulturzeiträumen, immer noch eine gewisse Stabilität der Chromosomenzahlen. Damit wäre Oenothera erfreulicherweise eine der wenigen Pflanzen, die in Gewebekultur eine relativ hohe genetische Stabilität aufweist. Bei Oenothera mag diese Stabilität auf der in diesem Formenkreis vorhandenen Komplexheterozygotie beruhen, die in der Meiose zur Chromosomenringkonfiguration führt und die bei Polyploidisierung offenbar nicht mehr befriedigend funktioniert. Tatsächlich sind bei Oenothera nur wenige tetraploide Formen bekannt.

Insgesamt gibt der in dieser Arbeit gemachte Versuchsansatz einen recht guten Überblick über das Verhalten von Oenothera in Gewebekultur. Aus den erzielten Ergebnissen wird ersichtlich, welche Pflanzenteile und welche Hormone und Hormonkombinationen am geeignetsten für bestimmte Redifferenzierungsversuche sind. Oenothera proliferiert in Gewebekultur rasch. Erfreulicherweise verhielten sich Plastommutanten und Genom/Plastom-Artbastarde in ihren Ansprüchen etwa gleich. Damit waren die Grundlagen für die Gewebekultur des gesamten Oenothera-Sortiments gegeben. Natürlich lassen sich in Einzelfällen die Kulturbedingungen noch weiter verbessern, um schneller zu größeren Materialmengen zu kommen.

Die erfolgreiche Anzucht aller Mutanten und der existierenden Genom/Plastom-Kombinationen brachte drei entscheidende Vorteile:

1. Es steht jetzt jederzeit genügend genetisch reines und stabiles Material für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

2. Das Material liegt steril vor und ist daher leicht und sauber zu ernten. Es entfällt oft notwendiges, umständliches Waschen und Sterilisieren.

3. Sekundärstoffe wie Schleime, Tannine oder Kristallnadeln, die die Isolation von Zellbestandteilen aus Oenotheren erheblich erschweren oder gar unmöglich machen, werden in der Gewebekultur in wesentlich geringerem Ausmaß gebildet als in Erdkultur.

Diese drei Vorteile wurden genutzt, um exemplarisch biochemische Analysen am Oenothera-Gesamtsortiment und an einer ausgewählten Gruppe von Plastommutanten durchzuführen.

B. Molekularbiologische Untersuchungen an Oenothera

Bei den Euoenotheren ließen sich die Wechselwirkungen zwischen Genom und Plastom vor mehreren Jahrzehnten durch die reversiblen Entwicklungsstörungen von Genom/Plastom-Artbastarden ebenso belegen wie durch Plastommutanten (Stubbe, 1959; Kutzelnigg & Stubbe, 1974). Solche Mutanten waren später auf ihre physiologischen Defekte hin, genauer charakterisiert worden (Hallier, 1980) - es konnten Mutanten mit Defekten in den beiden Photosystemen, dem Cytochrom b6/f-Komplex und der RuBPcase/oase zugeordnet werden -, die molekularen Grundlagen der Defekte blieben jedoch im Dunkeln.

Erst die vergangenen zehn Jahre brachten, durch den methodischen Fortschritt auf den Gebieten der Isolation, Darstellung und Identifizierung von DNA, RNA und Proteinen (Zusammenfassende Darstellung bei Edelman et al., 1982), auch Erfolge für das Verständnis der molekularen Vorgänge, die sich zwischen Genom und Plastom abspielen.

Der Vergleich der Proteinbandenmuster von Thylakoidmembranen der Wildtypen, der Genom/Plastom-Kombinationen und besonders der Mutanten der Euoenotheren zeigt den dualgenetischen Ursprung der komplexen Struktur klar. Einige Proteinbanden weisen nämlich eindeutig genom-, andere plastomabhängige Erbgänge auf (Abb. 27). Die Plastome lassen sich also nicht nur durch Restriktionsanalyse unterscheiden (Gordon et al., 1982), sondern Unterschiede von ihnen werden auch exprimiert. Die Genome ließen sich bisher ohnehin nur morphologisch und genetisch klassifizieren. Aufgrund des Membranmusters kann man die drei Genome und drei der fünf Plastome eindeutig identifizieren.

Die meisten Polypeptide der Thylakoidmembran sind heute identifiziert, ihrer Herkunft nach als plastom- bzw. genomkodiert bekannt, und ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Membrankomplexen ist nachgewiesen (Herrmann et al., 1985). So ließen sich Banden des Wildtypmusters von Oenothera den

Photosystemen, dem Cytochrom b6/f-Komplex oder der ATP-Synthase zuordnen (Abb. 27). Unter den varianten Polypeptiden befinden sich die plastomkodierte Untereinheit alpha der ATP-Synthase (Plastom III), die des P680 Chlorophyll a Apoproteins des Photosystem II Reaktionszentrums (Plastom IV und V), deren Gene beide auf dem Oenothera Plastidenchrososom lokalisiert sind (Bisanz-Seyer, 1985), unter den genomkodierten varianten Polypeptiden das sogenannte lysinreiche 34 kD Protein des Wasserspaltungsapparates und die Untereinheit 2 des PSI Komplexes (Westhoff, persönliche Mitteilung). Auch diese beiden Proteine sind mit unabhängigen Methoden als genomkodiert bestätigt worden (Westhoff et al., 1985). Es bleibt jetzt festzustellen, ob diese varianten Polypeptide etwa durch verschiedene sterische Konformationen zur Bastardbleichheit, d.h. der Inkompatibilität von Genom und Plastom beitragen, die ja Ausdruck des generellen Phänomens der Koevolution der genetischen Kompartimente ist.

Ein Vergleich der Bandenmuster der Mutanten mit denen der jeweiligen Wildtypen, zeigt in den meisten Fällen das Fehlen oder eine sehr stark reduzierte Menge definierter Banden. So fehlten Photosystem-I-Mutanten (Hallier, 1980) die charakteristische Bande des CP I-Komplexes, der die beiden P700 Chlorophyll-a-Apoproteine enthält. Ähnliches gilt für andere Mutanten mit Defekten im Cytochrom b6/f-Komplex, im Photosystem II oder der ATP-Synthase (siehe Ergebnisse). Die physiologischen Befunden, die Hallier in seiner Habilitationsschrift zusammengefaßt hat, stimmen mit den Proteinmustern überein. Für mehrere Mutanten, die früher nicht untersucht worden waren, wurden Hinweise auf Ursachen ihrer Defekte gefunden. Auf der Grundlage der Analysen von Hallier (1980) und der vorliegenden Arbeit hat Frau Olesch, im Rahmen ihrer Staatsexamensarbeit (1983), alle Mutanten mit Hilfe der "Immunotransfer"-Analyse (siehe Herrmann et al., 1985) weiterführend untersucht und die Defekte der einzelnen Mutanten genauer charakterisiert. Ihre Daten sind, von einer Ausnahme abgesehen, mit den hier vorliegenden in Einklang. Damit steht jetzt reichhaltiges Versuchsmaterial für eine Fülle molekularbiologischer Ver-

suchsansätze zur Verfügung. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz sei im folgenden skizziert.

Die RuBPcase/oase ist ein lösliches Stromaenzym in den Plastiden, das Schlüsselreaktionen des Calvinzyklus und der Photorespiration katalysiert. Es besteht aus zwei Typen von Untereinheiten, die jeweils achtfach pro Komplex vorhanden sind und von denen die größere plastom- die kleinere genomkodiert ist (Bottomley, 1980).

Das Oenothera-Sortiment enthält sechs Mutanten mit defekter RuBPcase/oase, von denen einige (die Mutanten I sigma, IV beta und V alpha) enzymatisch, immunologisch und gelelektrophoretisch untersucht worden waren (Hallier et al., 1978; Schmitt, 1978a, 1978b). Die damaligen Analysen an den Mutanten waren allerdings sowohl durch den Mangel an ausreichendem, genetisch reinem Blattmaterial limitiert, als auch durch Mängel der immunologischen Verfahren. So ist z.B. die SSU phylogenetisch nicht konservativ und reagiert deshalb nur in seltenen Fällen mit Antiseren gegen eine Fremd-SSU (siehe Ergebnisteil). Da aber damals ein heterologes Serum verwendet worden war, bestanden Zweifel, ob, wie die Autoren annahmen, die kernkodierte SSU in der Plastommutante I sigma ebenso fehlte, wie die plastomkodierte LSU. Desweiteren wurde die Auftrennung der LSU aus Wildtypplastiden des Plastoms II in zwei Banden beschrieben (Schmitt, 1978b).

Die Unsicherheit dieser früheren Ergebnisse und die Tatsache, daß (bis auf die Mutante I sigma) bei einem Vergleich der Proteinbandenmuster der Stromaproteine der Plastommutanten, bei allen anderen RuBPcase/oase-Mutanten, auch bei solchen mit sehr geringer Enzymaktivität, beide Untereinheiten vorhanden waren und sich mengenmäßig kaum von denen der Wildtypen unterschieden, veranlaßte mich, diese Gruppe der Mutanten mit verfeinerter Methodik erneut zu analysieren. Dazu wurden LSU und SSU der Wildtypen und der Mutanten mit Hilfe spezifischer Antiseren, durch "Immunoblot"-Analyse (Towbin et al., 1979) und Immunopräzipitation aus Lösungen

(Westhoff und Zetsche, 1981) serologisch verglichen. Auf diese Weise konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß es sich, mit Ausnahme der Mutante I sigma (s.u.), in allen Fällen, bei den Banden, die auf den Trenngelen an den entsprechenden Stellen wie beim Wildtyp auftraten, um LSU bzw. SSU handelte. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Reaktionen mit den Untereinheiten der RuBPcase/oase, bei gleichen Ausgangsmengen löslicher Plastidenproteine, vergleichbar waren. Dies bestätigt den schon früher von Schmitt (1978a) beschriebenen - bisher unerklärten - Unterschied zwischen vorhandenen Enzymmengen und den gemessenen Enzymaktivitäten bei diesen Mutanten. Der gelelektrophoretische Nachweis zweier immunologisch reagierender Banden im Bereich der LSU aus Plastiden des Plastoms II konnte nicht reproduziert werden. Es liegt der Verdacht nahe, daß es sich bei einer dieser Banden um ein Degradationsprodukt handelt, das bei ungünstigen Isolations- und Trennbedingungen auch bei anderen Plastomen auftauchen kann. Unter sorgfältigen Isolations- und Trennbedingungen gab es bei allen Plastomen nur eine Proteinbande, die mit Antiserum gegen die LSU reagierte.

Die Mutante I sigma unterscheidet sich von den übrigen RuBPcase/oase-Mutanten. Sie enthält die SSU, wenn auch nur in Spuren und ihr fehlt tatsächlich der LSU Protein des Wildtyps. Statt der zu erwartenden LSU mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kD, findet sich ein kleineres, immunologisch vergleichbares Protein von ca. 30 kD. Diese Ergebnisse, sowie Hinweise, daß es sich um eine monospezifische Mutante handelt (Gordon et al., 1982), machten eine genauere molekularbiologische Analyse dieser Mutante interessant. Sie hatte das Ziel, den molekularen Defekt zu suchen.

Da das Gen für die LSU plastomkodiert ist und im Chloroplasten transkribiert, translatiert und eventuell (Langridge, 1981) prozessiert wird, lag es zunächst nahe, die Plastiden-DNA dieser Mutante zu isolieren und sie mit der des Wildtyps zu vergleichen. Der von Gordon et al. (1980) durchgeführte Vergleich der Verdauungsmuster beider DNAs zeigte jedoch keinen Unterschied. Dies schloß aus, daß es sich bei dieser

Mutation um eine größere Veränderung (Deletion) im LSU-Gen handelt. Das ca. 30 kD große Protein, das sich durch "Immunoblot"-Analyse der löslichen Proteine und durch gekoppelte Transkription und Translation der Plastiden-DNA im S30-System von E. coli (Zubay et al., 1970; Bottomley & Whitfeld, 1979) in vivo bzw. in vitro in der Mutante nachweisen ließ (Hildebrandt et al., 1984) und das von Hallier et al. (1978) und Schmitt (1978a, 1978b) nicht gefunden worden war, ließ vermuten, daß die Ursache für die Bildung des Partialproduktes, im LSU-Strukturgen der Mutante und nicht an anderer Stelle der Biogenese zu suchen war. Nachdem als Produkt der zellfreien Translation der Plastiden-RNAs im Kaninchenretikulozytenlysat ebenfalls ein ca. 30 kD großes Protein identifiziert werden konnte, die mRNAs der Plastiden in der Mutante und im Wildtyp keinen erkennbaren Größenunterschied zeigten, der auf eine mögliche Deletion in der Mutanten-mRNA hingewiesen hätte, blieb als einzige Erklärung, daß die Mutation im LSU-Gen ein translationelles Stopsignal im Strukturgen ist. Mittlerweile konnte durch vergleichende Sequenzanalysen sowohl der Ort als auch die Art der Mutation bestimmt werden. Es ist eine Deletion von zwei Basenpaaren im Aminosäurecodon 270, wodurch das Aminosäurecodon 279 zu einem Stopcodon wird (Winter, persönliche Mitteilung).

Die zwei, dicht beieinander liegenden mRNA-Banden mit Molekulargewichten von ca. 1,6 und 1,8 kD, die sich beim Nachweis der mRNAs für die LSU der Mutante I sigma und des Wildtyps in den Plastiden von Oenothera, aber auch bei der zur Kontrolle eingesetzten Plastiden-RNA vom Spinat finden, sind mittlerweile bei vielen Objekten gefunden worden (Mullet et al., 1985; Erion, 1985). Beide Komponenten sind Produkte nur eines LSU-Gens. Die Transkription liefert wahrscheinlich die größere mRNA, die allerdings für die drei beschriebenen Arten in verschiedenen Abständen vom 5´-Ende der kodierenden Genregion beginnt. Die kleinere mRNA geht wohl durch Prozessierung aus der größeren hervor (Mullet et al., 1985). Bei Oenothera ist die Situation wohl gleich, wie vergleichende Sequenzanalysen des LSU-Gens wahrscheinlich machen (Winter, unveröffentlicht).

Eine endgültige Erklärung der Auswirkungen der Mutation, insbesondere für die geringen Mengen an SSU in den mutierten Plastiden der I sigma, die sich gelelektrophoretisch und immunologisch, nur auf stark überladenen Trenngelen der löslichen Plastidenproteine nachweisen ließen, steht noch aus. Allerdings konnte das Problem auf drei Alternativen eingeengt werden, deren Diskriminierung den Schlüssel für wertvolle Erkenntnisse über Mechanismen der Genom/Plastom-Kooperation liefern kann. Da die Menge, genauer die Translationsintensität, der mRNA im Cytosol offenbar gleich groß wie die des Wildtyps ist, ist ein Einfluß der Mutation des LSU-Gens auf die Transkription des SSU-Gens unwahrscheinlich. Vielmehr ist entweder die Translation der SSU-mRNA oder der Import der SSU-Vorstufe in das Organell inhibiert, oder die SSU wird - nach Import - in den Plastiden sehr schnell wieder abgebaut, wenn die vollständige LSU zur Bildung des Holoenzyms fehlt. Die Degradation überschüssiger SSU, wenn die Produktion an LSU durch Antimetabolite (Chloramphenicol) für die 70S Ribosomen reduziert wird, beschreiben Schmidt und Mishkind (1983) bei Chlamydomonas reinhardtii. Allerdings sind hier Artefaktreaktionen wegen der Antibiotikabehandlung nicht ausgeschlossen. Frühere Untersuchungen von Feierabend und Wildner (1978) ergaben nämlich bei thermosensitivem Roggen, daß in Abwesenheit der LSU die SSU akkumuliert wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit geprüft, mit Hilfe der Gewebekultur das umfassende Sortiment der Wildarten, Genom/Plastom-Artbastarde und Plastommutanten von Oenothera für molekularbiologische Analysen zugänglich zu machen.

1. Die Bedingungen für die Gewebekultur der Euoenothera Wildtypen, ihrer Genom/Plastom-Artbastarde und Plastommutanten, die auf Erdkultur nicht lebensfähig sind, wurden verfeinert. Durch extern zugeführte Hormone lassen sich Kallusbildung oder Organogenese (Wurzel- oder Sproßbildung durch Auxine bzw. Cytokinine, ganze Pflänzchen durch Kombination beider Phytohormone) gezielt auslösen. Das künstliche Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure unterdrückt jegliche Differenzierung, führt zu rapidem Kalluswachstum und, im Gegensatz zu vielen anderen Dikotylen, bei Oenothera nur in geringem Maße zu Chromosomenaberrationen. Aus diesem Gesamtansatz heraus war es schließlich möglich, das Oenothera-Sortiment vollständig in Gewebekultur heranzuziehen und zu erhalten. Dies axenisch kultivierte Material produzierte dabei nur geringe Mengen an (schädlichen) Sekundärstoffen. Die Möglichkeit, Material auch der Genom/Plastom-Artbastarde und der Plastommutanten in ausreichenden Mengen, physiologisch vergleichbarem und genetisch stabilem Zustand durch Gewebekultur zu erhalten, wurde für molekularbiologische Untersuchungen genutzt.

2. Die vergleichende gelelektrophoretische Analyse der Thylakoidmembranproteine aus Plastiden von Wildtypen und von Genom/Plastom-Artbastarden zeigt Komponenten mit plastomassoziierten (P_{680} Chlorophyll a Apoprotein des Photosystem II Reaktionszentrums, Untereinheit alpha der ATP-Synthase) wie genomassoziierten (34 kD Protein des Wasserspaltungsapparates, Untereinheit 2 des Photosystem I Reaktionszentrums) Erbgängen. Dies schließt die Möglichkeit ein, daß die (reversiblen) Entwicklungsstörungen u.a. der Thylakoidmembran in vielen Artbastarden (Bastardbleichheit) wenigstens zum Teil auf sterischen Gründen beruhen.

3. Der Vergleich der Polypeptidmuster von Thylakoidmembranproteinen aus Plastiden der etwa 50 Plastommutanten mit Photosynthesedefekten mit denen des jeweils zugehörigen Wildtyps belegt, daß die Defekte in den Mutanten durch das Fehlen von Polypeptiden, eine geringere Synthese oder geringere Stabilität derselben verursacht werden. Der größte Teil des Mutantensortiments konnte in bestimmte Defektgruppen eingeteilt werden. So wurden Mutanten mit Defekten in den Photosystem I oder II Reaktionszentren, im Cytochrom b6/f Komplex, in der ATP-Synthase und in der RuBPcase/oase identifiziert. Dabei wurden frühere physiologische Befunde an einzelnen Mutanten bestätigt und ergänzt.

4. Die Gruppe der Plastommutanten mit Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase-Defekten wurden detaillierter molekularbiologisch untersucht. Beim Vergleich der Polypeptidmuster der Stromaproteine mutierter Plastiden mit denen der zugehörigen Wildtypen, zeigte eine Mutante, die Mutante I sigma, ein vom Wildtyp abweichendes Polypeptidmuster; ihr fehlte die charakteristische Bande der größeren, im Plastom kodierten Untereinheit dieses Enzyms. Die (kernkodierte) kleine Untereinheit war nur in geringer Menge vorhanden. Der Defekt im plastidären Chromosom der Mutante stellte sich als ein translationales Stopsignal im Strukturgen der LSU heraus, so daß *in vivo* und *in vitro* von einer vollständigen mRNA nur ein Partialprodukt des Proteins dekodiert wird. Die Poly A^+-mRNA für die SSU im Cytosol hingegen ist in vergleichbaren Mengen wie beim Wildtyp vorhanden. Die Frage, ob die geringeren Mengen an SSU in den Plastiden der Mutante durch einen raschen Abbau des Polypeptids nach Import in das Organell verursacht wird, weil es mit dem Partialprodukt der LSU nicht in der Lage ist, das Holoenzym zu bilden, oder aber, ob bereits die Translation der Vorstufe an cytosolischen Ribosomen oder Importbeeinflussung dafür verantwortlich sind, konnte nicht abschließend geklärt werden. Mutanten dieser Art stellen ein wertvolles Versuchsmaterial dar, um die zentralen Mechanismen der Kooperation von Genom und Plastom verstehen zu lernen.

LITERATURVERZEICHNIS
==========

Aitchison, P.A., Macleod, A.J., and Yeoman, M.M.
Growth patterns in tissue (callus) cultures;
in: Botanical Monographs Vol 11: Plant tissue and cell culture; H.E. Street (ed), 2nd Ed.; pp 267-306;
Blackwell Scientific Pulications, Oxford, 1977

Arnon, D.J.
Copper enzymes in isolated chloroplasts;
Plant Physiol. 24: 1-15 (1949)

Avrameas, S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of conjugates for the detection of antigenes and antibodies; Immunochemistry 6: 43-52 (1969)

Baltimore, D.
Purification and properties of polyvirus double-stranded ribonucleic acid;
J. Mol. Biol. 18: 421-428 (1966)

Bayliss, M.W.
Origin of chromosome number variation in cultured plant cells; Nature (London) 246: 529-530 (1973)

--"--
The effects of growth in vitro on the chromosome complement of Daucus carota (L.) suspension cultures;
Chromosoma 51: 401-416 (1975)

--"--
Chromosomal variations in plant tissues in culture;
in: Intl. Rev. Cytol. Suppl. 11 A: Perspectives in plant cell and tissue culture; I.K. Vasil (ed);
pp 113-144; Academic Press, New York, 1980

Bennici, A., Buiatti, M., D'Amato, F., and Pagliai, M.
Nuclear behaviour in Haplopappus gracilis callus grown in vitro on different culture media;
Coll. Intern. C. N. R. S. No. 193: 245-250 (1971)

Bennici, A.
Cytological analysis of roots, shoots and plants regenerated from suspension and solid in vitro cultures of haploid Pelargonium;
Z. Pflanzenzüchtung 72: 199-205 (1974)

Binding, H.
Organogenese an Kallus von Petunia hybrida;
Z. Pflanzenphysiol. 65: 359-364 (1971)

Bisanz-Seyer, C.
Studien zur Expression der Plastidenchromosomen von Oenothera hookeri und Spinacia oleracea;
Disssertation, Universität Düsseldorf, 1985

Bonner, W.M. and Laskey, R.A.
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels;
Eur. J. Biochem. 46: 83-88 (1974)

Bottomley, W. and Whitfeld, P.R.
Cell-free transcription and translation of total spinach chloroplast DNA;
Eur. J. Biochem. 93: 31-39 (1979)

Bottomley, W.
Fraction I Protein;
in: Chloroplasts - Results and problems in cell differentiation; J. Reinert (ed); pp 179-199; Springer, Berlin, 1980

Broglie, R.M., Hunter, C.N., Delepelaire, P., Niederman, R.A., Chua, N.-H., and Clayton, R.K.
Isolation and characterization of the pigment-protein complexes of Rhodopseudomonas sphaeroides by lithiumdodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 87-91 (1980)

Brown, R.H., Armitage, T.L., and Merrett, M.J.
Ribulose diphosphat carboxylase synthesis in Euglena. III. Serological relationships of the intact enzyme and its subunits;
Plant Physiol. 58: 773-776 (1976)

Buiatti, M. and Bennici, A.
Callus formation and habituation in Nicotiana species in relation of the specific ability for dedifferentiation;
Lincei-Rend. Sci. Fis. Mat. Nat. 48: 261-269 (1970)

Buiatti, M., Baroncelli, S., and Bennici, A.
Genetics of growth and differentiation in vitro of Brassica oleratia var. botrytis. IV. Genotype-Hormone Interactions;
Z. Pflanzenzüchtung 73: 298-302 (1974)

Burke, J.J., Steinback, K.E., and Arntzen, C.J.
Analysis of the light-harvesting pigment-protein complex of wild type and a chlorophyll-b-less mutant of barley;
Plant Physiol. 63: 237-243 (1979)

Chamberlain, J.P.
Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water soluble fluor, sodium salicylate;
Anal. Biochem. 98: 132-135 (1979)

Chua, N.-H. and Bennoun, P.
Thylakoid membrane polypeptides of Chlamydomonas reinh. wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2175-2179 (1975)

Chua, N.-H., Matlin, K., and Bennoun, P.
A chlorophyll-protein complex lacking in photosystem I mutants of Chlamydomonas reinh.;
J. Cell Biol. 67: 361-377 (1975)

Cleland, R.E.
Oenothera, Cytogenetics and Evolution; Academic Press, London, 1972

Constantin, M.J.
Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants;
Env. Exp. Bot. 21: 359-368 (1981)

Covey, S.N. and Grierson, D.
Subcellular distribution and properties of poly (A)-containing RNA from cultured plant cells;
Eur. J. Biochem. 63: 599-606 (1976)

D'Amato, F.
The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures;
in: Crop genetic resources for today and tommorrow; O. Frankel and J.C. Hawkes (eds); pp 333-348; Cambridge University Press, 1975

--"--
Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures;
in: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture; J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds); pp 343-357; Springer, Berlin 1977

--"--
Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants;
in: Frontiers of plant tissue culture; T.A. Thorpe (ed); pp 287-295; IAPTC Press, Calgary, 1978

Delepelaire, P. and Chua, N.-H.
Lithium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis of thylakoid membranes at 4°C: Characterizations of two additional chlorophyll a-protein complexes;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 111-115 (1979)

--"--
Isolation, purification and characterization of chlorophyll-protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis at low temperatures;
in: Methods in chloroplast molecular biology; M. Edelman et al. (eds); pp 835-843; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Denhardt, D.J.
A membrane filter technique for the detection of complementary DNA;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23: 641-646 (1966)

Donn, G., Hess., D., and Potrykus, I.
Differentiation in calli originated from protoplasts of Petunia hybrida;
Z. Pflanzenphysiol. 69: 423-437 (1973)

Edelman, M., Hallick, R., and Chua, N.-H.
Methods in chloroplast molecular biology;
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Engvild, K.C.
Callus and cell suspension cultures of carnation;
Physiol. Plant. 26: 62-66 (1972)

--"--
Shoot differentiation in callus cultures of Datura innoxia; Physiol. Plant 28: 155-159 (1973)

Erion, J.L.
Characterization of the mRNA transcripts of the maize, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit gene; Plant Molec. Biol. 4: 169-179 (1985)

Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y. (eds)
Handbook of plant cell culture Vol I;
Macmillan Publishing Co., New York, 1983

Feierabend, J. and Wildner, G.
Formation of the small subunit in the absence of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in 70 S ribosome-deficient rye leaves;
Arch. Biochem. Biophys. 186: 283-293 (1978)

Fletcher, R.A. and McCullagh, D.
Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons; Planta 101: 88-90 (1971)

Fonnesbech, M.
Growth hormones and propagation of Cymbidium in vitro;
Physiol. Plant. 27: 310-316 (1972)

--"--
Organic nutrients in the media for propagation of Cymbidium in vitro;
Physiol. Plant. 27: 360-364 (1972)

Fox, J.E.
Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue cultures;
Physiol. Plant 16: 793-803 (1963)

Gautheret, R.J.
The nutrition of plant tissue cultures;
Annu. Rev. Plant. Physiol. 6: 433-484 (1955)

Gerlach, D.
Botanische Mikrotechnik; pp 256-258;
Thieme, Stuttgart, 1969

Girard, J., Chua, N.-H., Bennoun, P., Schmidt, G., and Delosme, M.
Studies on mutants dificient in the photosystem I reaction centers in Chlamydomonas reinh.;
Curr. Genet. 2: 215-221 (1980)

Gordon, K.H.J., Hildebrandt, J.W., Bohnert, H.J., Herrmann, R.G., and Schmitt, J.M.
Analysis of the plastid DNA in an Oenothera plastome mutant deficient in ribulose bisphosphate carboxylase;
Theor. Appl. Genet. 57: 203-207 (1980)

Gordon, K.H.J., Crouse, E.J., Bohnert, H.J., and Herrmann, R.
Physical mapping of differences in chloroplast DNA of the five wild-type plastomes in Oenothera subsection Euoenothera;
Theor. Appl. Genet. 61: 373-384 (1982)

Gray, J.C.
Use of proteolytic inhibitors during isolation of plastid proteins;
in: Methods in chloroplast molecular biology; M. Edelman et al. (eds); pp 1094-1102; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Haberlandt, G.
Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen;
Sitz. ber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. 3: 69-92 (1902)

Hager, D.A. and Burgess, R.R.
Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity; results with sigma-subunit of Escherichia coli RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes;
Anal. Biochem. 109: 76-86 (1980)

Hallier, U.W., Heber, U. und Stubbe, W.
Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von Oenothera
I. Der reduktive Pentosephosphatzyklus
Z. Pflanzenphysiol. 58: 222-239 (1968)

Hallier U.W.
Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von Oenothera
II. Die Bildung von ATP und NADPH
Z. Pflanzenphysiol. 58: 289-299 (1968)

Hallier, U.W., Schmitt, J.M., Heber, U., Chaianova, S.S., and Volodarsky, A.D.
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-deficient plastome mutants of Oenothera;
Biochim. Biophys. Acta 504: 67-83 (1978)

Hallier, U.W. and Heber, U.W.
Cytochrome f deficient plastome mutants of Oenothera
Photosynthet. Organelles, Spec. Issue Plant & Cell Physiol., pp 257-273 (1977)

Hallier, U.W.
Zusammenhänge zwischen der genetischen Information des Plastoms und der Biochemie der Photosynthese;
Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf, 1980

Havránek, P. and Novák, F.J.
The bud formation in the callus cultures of Allium sativum L.;
Z. Pflanzenphysiol. 68: 308-318 (1973)

Heber, U.
Stoichiometry of reduction and phosphorylation during illumination of intact chloroplasts;
Biochim. Biophys. Acta 305: 140-152 (1973)

Heinz, D.J. and Mee, G.W.P.
Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones, derived from callus tissues;
Am. J. Bot. 58: 257-262 (1971)

Helenius, A. and Simons, K.
Solubilization of membranes by detergents;
Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79 (1975)

Herrmann, R.G. and Possingham, J.V.
Plastid DNA - the plastome;
in: Chloroplasts - Results and problems in cell differentiation; J. Reinert (ed); pp 45-96; Springer, Berlin, 1980

Hermann, R.G., Seyer, P., Schedel, R., Gordon, K., Bisanz, C., Winter, P., Hildebrandt, J.W., Wlaschek, M., Driesel, A.J., and Sears, B.B.
The plastid chromosomes of several dicotyledons;
in: Biological chemistry of organelle formation; T. Bücher et al., (eds); pp 97-112; Springer, Berlin, 1980

Herrmann, R.G.
The preparation of circular DNA from plastids;
in: Methods in chloroplast molecular biology; M. Edelman et al., (eds); pp 259-280; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Herrmann, R.G., Westhoff, P., Alt, J., Winter P., Tittgen, J., Bisanz, C., Sears, B.B., Nelson, N., Hurt, E., Hauska, G., Viebrock, A., and Sebald, W.
Identification and characterization of genes for polypeptides of the thylakoid membrane;
in: Structure and function of plant genomes; O. Ciferri and L. Dure III (eds); pp 143-153; Plenum Publ. Corp., London, 1983

Herrmann, R.G., Westhoff, P., Alt., J., Tittgen, J., and Nelson, N.
Thylakoid membrane proteins and their genes;
in: Molecular form and function of the plant genome; L. van Vloten-Doting et al. (eds); Plenum Publ. Corp., London, im Druck

Hess, D.
Pflanzenphysiologie;
Uni-Taschenbücher 15: 223-242 (1974)

Hildebrandt, J.W.
Zur Protoplasten- und Kalluskultur von Oenothera;
Staatsexamensarbeit, Universität Düsseldorf, 1976

Hildebrandt, J., Bottomley, W., Moser, J., and Herrmann, R.G.
A plastome mutant of Oenothera hookeri has a lesion in the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase;
Biochim. Biophys. Acta 783: 67-73 (1984)

Hiller, R.G., Lindberg Møller, B., and Høyer-Hansen, G.
Characterization of six putative photosystem I mutants in barley;
Carlsberg Res. Commun. 45: 315-328 (1980)

Høyer-Hansen, G.
Identification of haem-proteins in thylakoid polypeptide patterns of barley;
Carlsberg Res. Commun. 45: 167-176 (1980)

Jackson, C., Dench, J.E., Hall, D.O., and Moore, A.L.
Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilising silica sol gradient centrifugation;
Plant Physiol. 64: 150-153 (1979)

Jacobsen, H.-J.
Biochemical mechanisms of plant hormone activity;
in: Handbook of plant cell culture Vol I; J. Evans et al. (eds), pp 672-695; Macmillan Publishing Co., New York, 1983

Jensen, R.G. and Bassham, J.A.
Photosynthesis by isolated chloroplasts;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 1095-1101 (1966)

Kahn, A. and v. Wettstein, D.
Macromolecular physiology of plastids II. Structure of isolated spinach chloroplasts;
J. Ultrastruct. Res. 5: 557-574 (1961)

Kao, K.N.
A chromosome staining method;
in: Plant tissue culture methods; O. Gamborg and R. Wetter (eds); pp 63-65; Natl. Res. Council of Canada, Sascatoon, Saskatchewan, 1975

Kögl, F., Haagen Smit, A.J. and Erxleben, H.
Über ein neues Auxin ("Heteroauxin"), aus Harn;
Z. Physiol. Chem. 228: 90-103 (1934)

--"--
Über den Einfluß der Auxine auf das Wurzelwachstum und über die chemische Natur des Auxins der Graskoleoptilen;
Z. Physiol. Chem. 228: 104-112 (1934)

Kolodner, R.D. and Tewari, K.K.
The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants;
Biochim. Biophys. Acta 402: 372-390 (1975)

Kutzelnigg, H.
Versuche zur Auslösung von Plastommutationen bei Oenothera;
Dissertation, Universität Düsseldorf, 1968

Kutzelnigg, H. and Stubbe, W.
Investigations on plastome mutants in Oenothera
I. General considerations;
Sub-Cell. Biochem. 3: 73-89 (1974)

Kutzelnigg, H., Meyer, B., and Schötz, F.
Untersuchungen an Plastom-Mutanten von Oenothera
II. Überblick über die Ultrastruktur der mutierten Plastiden;
Biol. Zbl. 94: 513-526 (1975a)

Kutzelnigg, H., Meyer, B., and Schötz, F.
III. Vergleichende ultrastrukturelle Charakterisierung der Mutanten;
Biol. Zbl. 94: 527-538 (1975b)

Laemmli, U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4;
Nature (London) 227: 680-685 (1970)

Langridge, P.
Synthesis of the large subunit of spinach ribulose bisphosphate carboxylase may involve a precursor polypeptide;
FEBS Lett. 123: 85-89 (1981)

Laursen, R.A., Horn, M.J., and Bonner, A.G.
Solid phase Edman degradation. The use of p-phenyl diisothiocyanate to attach lysin- and arginine-containing peptides to insoluble resins;
FEBS Lett. 21: 67-70 (1972)

Leaver, C.J. and Gray, M.W.
Mitochondrial genome organization and expression in higher plants;
Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 373-402 (1982)

Letham, D.S., Goodwin, P.B., and Higgins, T.J.V.
Phytohormones and related compounds - A comprehensive treatise Vol II: Phytohormones and the development of higher plants;
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1978

Lutz, A.
Amplitudes morphogenetiques des cultures de tissus d´origine unicellulaire
in: Les cultures de tissus de plantes; pp 163-168; Coll. Intern. C.N.R.S. No. 193, 1971

Maurer, H.R.
Disk-Elektrophorese - Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese;
de Gruyter, Berlin, 1968

Maurer, P.H. and Callahan, H.J.
Proteins and polypeptides as antigenes;
in: Methods Enzymol. Vol 70; H. Van Vunakis and J.J. Langone (eds); pp 49-70; Academic Press, New York, 1980

McDonnell, M.W., Simon, M.N., and Studier, F.W.
Analysis of restriction fragments of T 7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels;
J. Mol. Biol. 110: 119 (1977)

McMaster, G.K. and Carmichael, G.G.
Analysis of single- and double-stranded nucleic acids in polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4835-4838 (1977)

Melchers, G. and Labib, G.
Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für die Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung;
Ber.Dtsch. Bot. Ges. 83: 129-150 (1970)

Messerschmidt, M.
Kallusbildung und Differenzierung aus isolierten Protoplasten von Pharbitis nil;
Z. Pflanzenphysiol. 74: 175-178 (1974)

Metz, J. and Bishop, N.I.
Identification of a chloroplast membrane polypeptide associated with the oxidizing site of photosystem II by the use of select low-fluorescent mutants of Scenedesmus;
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 560-566 (1980)

Miller, C.O., Skoog, F., v.Saltza, M., and Strong, F.M.
Kinetin a cell division factor from desoxyribonucleic acid;
J. Am. Chem. Soc. 77: 1392 (1955)

Moore, T.C.
Biochemistry and physiology of plant hormones;
Springer, New York, 1979

Morgenthaler, J.-J., Price, C.A., Robinson, J.M., and Gibbs, M.
Photosynthetic activity of spinach chloroplasts after isopycnic centrifugation on gradients of silica;
Plant Physiol. 54: 532-534 (1974)

Morgenthaler, J.-J., Marsden, M.P.F., and Price, C.A.
Factors affecting the separation of photosynthetically competent chloroplasts in gradients of silica sols;
Arch. Biochem. Biophys. 168: 289-301 (1975)

Morré; D.J. and Key, J.L.
Auxins;
T.Y. Cromwell Comp., 1967

Murashige, T. and Skoog, F.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures;
Physiol. Plant. 15: 473-497 (1962)

Murashige, T. and Nakano, R.
Morphogenetic behaviour of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence;
Am. J. Bot. 52: 819-827 (1965)

--"--
Chromosome complement as a determinant of the morphogenetic potential of tobacco cells;
Am. J. Bot. 54: 963-970 (1967)

Murashige, T.
Plant propagation through tissue cultures;
Annu. Rev. Plant. Physiol. 25: 135-166 (1974)

Mullet, J.E., Orozco, E.M. Jr., and Chua, N.-H.
Multiple transcripts for higher plant rbcL and atpB genes and localization of the transcription initiation site of the rbcL gene;
Plant Molec. Biol. 4: 39-54 (1985)

Nagata, T. and Takebe, I.
Plating of isolated tobacco mesophyll-protoplasts on agar medium;
Planta 99: 12-20 (1971)

Narayanaswami, S.
Regeneration of plants from tissue culture;
in: Plant cell, tissue, and organ culture; J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds); pp 179-206; Springer, Berlin, 1977

Nuti-Ronchi, V., Martini, G., and Buiatti, M.
Genotype-hormon interaction in the induction of chromosome aberrations: Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin on tissue cultures;
Mut. Res. 36: 67-72 (1976)

Ogura, H.
Studies on the genetic instability of cultured tissues and the regenerated plants - Effects of auxins and cytokinins on the mitosis of Vicia faba cells;
Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture; A. Fujiwara (ed); pp 433-434; Abe Photoprinting Co., Ltd., Tokio, 1982

Olesch, B.
Analyse plastidärer und nukleärer Mutanten von Oenothera;
Staatsexamensarbeit Universität Düsseldorf, 1983

Palmiter, R.D.
Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation - Comparable rates of polypeptide initiation and elongation on ovalbumin and globin messenger ribonucleic acid in a rabbit reticulocyte lysate;
J. Biol. Chem. 248: 2095 (1973)

Partanen, C.R.
Plant tissue culture in relation to developmental cytology;
Intl. Rev. Cytol. 15: 215-243 (1963)

Partanen, C.R.
Tissue culture methods and application;
in: P.F. Kruse and M.K. Patterson (eds); pp 791-797;
Academic Press, New York, 1973

Parthier, B.
The role of phytohormones (cytokinins) in chloroplast development;
Biochem. Physiol. Pflanzen 174: 173-214 (1979)

Parthier, B. and Boulter, D.
Nucleic acids and proteins in plants II - Encyclopedia of plant physiology new series Vol 14 B; Springer, Berlin, 1982

Pelham, H.R.B. and Jackson, R.J.
An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates;
Eur. J. Biochem. 67: 247-256 (1976)

Piccioni, R., Bellemare, G., and Chua, N.-H.
Methods of polyacrylamide gel electrophoresis in the analysis and preparation of plant polypeptides;
in: Methods in chloroplast molecular biology; M. Edelman et al. (eds); pp 985-1014; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Prassad, G. and Das, K.
Effects of some growth substances on mitosis;
Cytologia 42: 323-329 (1977)

Pringle, J.R.
Methods for avoiding proteolytic artefacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts;
Methods in Cell Biology XII: 149-184 (1975)

Reichlin, M.
The use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides;
in: Methods Enzymol. Vol 70; H. Van Vunakis and J.J. Langone (eds); pp 159-165; Academic Press, New York, 1980

Reinert, J. and Küster, H.J.
Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von Crepis capillaris (L) Wallr.;
Z. Pflanzenphysiol. 54: 213-222 (1966)

Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S.
Plant cell, tissue, and organ culture;
Springer, Berlin, 1977

Renner, O.
Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution;
Ber. Verh. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-phys. Kl. 86: 241-266 (1934)

Reynolds, J.A. and Tanford, Ch.
The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes;
J. Biol. Chem. 245: 5161-5165 (1970)

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P.
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I;
J. Mol. Biol. 113: 237-251 (1977)

Salmia, M.A.
Cytology of two Lathyrus tissues grown in vitro;
Ann. Bot. Fennici 11: 279-284 (1974)

Skoog, F. and Miller, C.O.
Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro;
in: The biological action of growth substances; H.K. Porter (ed); pp 118-130; Academic Press, New York, 1957

Sunderland, N.
Nuclear cytology;
in: Plant tissue and cell culture; H.E. Street (ed);
pp 177-205; Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1977

Schaffner, W. and Weissmann, C.
A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution;
Anal. Biochem. 56: 502-514 (1973)

Schleiden, M.J.
Beiträge zur Phytogenesis;
Müllers Arch. Anat., Physiol. Wiss. Med. 137-176 (1838)

Schmidt, G.W. and Mishkind, M.L.
Rapid degradation of unassembled ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunits in chloroplasts;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2632-2636 (1983)

Schmitt, J.M. and Herrmann, R.G.
Fractionation of cell organelles in silica sol gradients;
in: Methods in cell biology Vol 15; M. Prescott (ed);
pp 177-200; Academic Press, New York, 1977

Schmitt, J.M.
Oenothera plastome mutants lacking fraction I protein;
in: Chloroplast development; G. Akoyunoglou et al. (eds);
pp 739-743; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1978a

Schmitt, J.M.
Zur Funktion des genetischen Apparates der Plastiden: Nukleinsäuresynthese und plastomkodierte Proteine; Dissertation, Universität Düsseldorf, 1978b

Schneider, V. and Hallier, U.
Polyvinylpyrrolidone as protective substance against inhibition of enzyme systems caused by tannins; Planta 94: 134-139 (1970)

Schwann, T.
Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen (1839); in: "Ostwalds Klassiker der Exakten Wissenschaften", No. 176; Engelmann Leipzig, 1910

Schwemmle, B.
Über den Einfluß von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Reimannia-Oenotheren; Planta 58: 619-646 (1962)

Steward, F.C. and Caplin, S.M.
A tissue culture from potato tubers. The synergetic action of 2,4-D and coconut milk; Science 113; 518-520 (1951)

Street, H.E.
Plant tissue and cell culture; Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1977

Stubbe, W.
Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von Oenothera suavolens; Z. Vererbungsl. 85: 180-209 (1953)

--"--
Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei Oenothera; Z. Vererbungsl. 90: 288-298 (1959)

Stubbe, W.
Untersuchungen zur genetischen Analyse der Plastoms von Oenothera;
Z.Bot. 48: 191-218 (1960)

--"--
Extrem disharmonische Genom-Plastom-Kombinationen und väterliche Plastidenvererbung bei Oenothera;
Z. Vererbungsl. 94: 392-411 (1963)

--"--
The role of the plastome in the evolution of the genus Oenothera;
Genetica 35: 28-33 (1964)

--"--
Die Plastiden als Erbträger;
in: Probleme der biologischen Reduplikation; P. Sitte (ed); pp 273-286; Springer, Berlin, 1966

--"--
Origin and continuity of plastids;
in: Results and problems in cell differentiation; J. Reinert and H. Ursprung (eds); pp 65-81; Springer, Berlin, 1971

Stubbe, W. and Herrmann, R.G.
Selection and maintenance of plastome mutants and interspecific genome/plastome hybrids from Oenothera;
in: Methods in chloroplast molecular biology;
M. Edelman et al. (eds); pp 149-169, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982

Studier, F.W.
Analysis of bacteriophage T 7 early RNAś and proteins on slab gels;
J. Mol. Biol. 79: 237-248 (1973)

Takabe, T., Nishimura, M., and Akazawa, T.
Isolation of intact chloroplasts from spinach leaf by centrifugation in gradients of modified silica "Percoll";
Agric. Biol. Chem. 43: 2137-2142 (1979)

Thimann, K.V.
The natural plant hormones;
in: Plant Physiol. Vol IV B: Physiology of development;
F.C. Steward (ed); Academic Press, New York, 1972

Thomas, P.S.
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205 (1980)

Thomas, E. and Street; H.E.
Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna;
Ann. Bot. 36: 239-247 (1972)

Thorpe, T.A.
Organogenesis in vitro: Structural, physiological, and biochemical aspects;
in: Intl. Rev. Cytol. Suppl. 11 A: Perspectives in plant cell and tissue culture; I.K. Vasil (ed); pp 71-111;
Academic Press, New York, 1980

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354 (1979)

Tran Than Van, M.
Regulation of morphogenesis;
in: Plant tissue culture and its bio-technological application; W. Barz et al. (eds); pp 367-385; Springer, Berlin, 1977

Tulecke, W.
Recent progress and the goals of plant tissue culture;
Bulletin of the Torrey Botanical Club 88: 350-360 (1969)

Vasil, I.K.
Intl. Rev. Cytol. Suppl. 11 A: Perspectives in plant cell and tissue culture; Academic Press, New York, 1980

Wahl, G.M., Stern, M., and Stark, G.R.
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3683-3687 (1979)

Went, F.W.
Wuchsstoff und Wachstum;
Rec. Trav. Bot. Néer. 25: 1-116 (1928)

Westhoff, P. and Zetsche, K.
Regulation of the synthesis of ribulose-1,5-bishosphate carboxylase and its subunits in the flagellate Chlorogonium elongatum;
Eur. J. Biochem. 116: 261-267 (1981)

Westhoff, P., Jansson, C., Klein-Hitpaß, L., Berzborn, R., Larsson, C., and Bartlett, S.G.
Intracellular coding sites of polypeptides associated with photosynthetic oxygen evolution of photosystem II;
Plant Molec. Biol. 4: 137-146 (1985)

White, P.R.
Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium;
Plant Physiol. 9: 585-600 (1934)

--"--
Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots;
Growth 7: 53-65 (1943)

Wienand, U., Schwartz, Z., and Feix, G.
Electrophoretic elution of nucleic acids from gels adapted for subsequent biological tests;
FEBS Lett. 98: 319-323 (1979)

Wilson, H.M. and Street, H.E.
The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of Hevea brasiliensis;
Ann. Bot. 39: 671-682 (1975)

Yeoman, M.M. and Forche, E.
Cell proliferation and growth in callus cultures;
in: Intl. Rev. Cytol. Suppl. 11 A: Perspectives in plant cell and tissue cultures; I.K. Vasil (ed);
pp 1-24; Academic Press, New York, 1980

Zubay, G., Chambers, D.A., and Cheong, L.C.
Cell-free studies on the regulation of the lac operon;
in: The lac operon; J. Beckwith and D. Siper (eds);
pp 375-391; Cold Spring Harbor Labs, New York, 1970

Zurawski, G., Perrot, B., Bottomley W., and Whitfeld, P.R.
The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA;
Nucleic Acids Res. 9: 3251-3270 (1981)

DANKSAGUNG
==========

Diese Arbeit entstand in der stimulierenden Atmosphäre des Botanischen Instituts der Universität Düsseldorf unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. R.G. Herrmann. Ihm danke ich für sein kritisches Interesse am Fortgang dieser Arbeit, das er durch zahlreiche Diskussionen und praktische Anregungen zum Ausdruck brachte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Bünemann danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. W. Stubbe sei für die Überlassung von Saatgut der Wildarten, Genom/Plastom-Artbastarde und Plastommutanten von Oenothera herzlich gedankt.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. J. Moser vom Institut für klinische Physiologie für seine Hilfe bei der Herstellung der Antiseren gegen die große und kleine Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase/oxygenase.

Viele Freunde und Kollegen standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke Hans-Jürgen Bohnert, Warwick Bottomley, Nam-Hai Chua, Karl Gordon, Willy Rogmann, Barbara B. Sears, Barbara Schiller, Jürgen Schmitt, Monika Streubel, Jochen Tittgen, Peter Winter und Peter Westhoff.

Ganz besonders aber danke ich meiner Frau Renate, die mich immer wieder ermutigte und mir half, diese Arbeit fertigzustellen.

LEBENSLAUF

05.10.1947	als Sohn des Technischen Zeichners Georg Hildebrandt und seiner Ehefrau Anneliese geb. Käppler, in Mühlhausen in Thüringen geboren
1954-1959	Besuch der Grundschule in Mühlhausen und Düsseldorf
1959-1967	Besuch des städtischen "Leibniz"-Gymnasiums in Düsseldorf
05.07.1967	Abitur
1967-1969	Wehrdienst
1969-1970	Praktikant am "Max-Planck-Institut" für Biochemie in München
1970-1976	Studium der Biologie und Chemie an der Universität Düsseldorf
1976	Staatsexamensarbeit bei Prof. Dr. R.G. Herrmann über das Thema: "Zur Protoplasten- und Kalluskultur von Oenothera"
1976	Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien in Biologie
26.08.1978	Heirat mit Renate Held aus Stuttgart
23.11.1980	Geburt unserer Tochter Ursula Christiane

Die Daten zur vorliegenden Dissertation wurden von Januar 1977 bis Dezember 1984 am Institut für Biologie der Universität Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. R.G. Herrmann erarbeitet.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606